

Aus dem Bereich Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

UNTERSUCHUNG ZYTOTOXISCHER MECHANISMEN IN HUMANEN NATÜRLICHEN KILLERZELLEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von

Christian Backes

geb. am 03.04.1983 in Saarburg

Homburg 2016

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Biophysik am Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Referent:
Koreferent:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Markus Hoth
Prof. Dr. Richard Zimmermann
29.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	6
2 Summary	8
3 Einleitung	10
3.1 Natürliche Killerzellen.....	10
3.2 Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose.....	11
3.3 FRET-Sensor Casper3-GR und stabile Zielzelllinien	14
3.4 Ziel der Arbeit	17
4 Material und Methoden	19
4.1 allgemeiner Laborbedarf	19
4.2 Erläuterung wichtigster Materialien, Geräte und Programme	22
4.3 Bereits etablierte Methoden	27
4.4 Entwickelte und adaptierte Methoden	29
5 Ergebnisse	43
5.1 Test der Aufreinigungseffizienz der NK Zellen durch FACS	43
5.2 Test des IL-2 Einflusses auf primäre, humane NK	44
5.3 Stabile Zelllinie Jurkat E6-1 pCasper und K562 pCasper	46
5.4 CD95 Nachweis in den Zielzellen	50
5.4.1 CD95 Analyse per qRT-PCR	50
5.4.2 CD95 Analyse per FACS	50
5.5 FRET Donor Ratio, Korrekturfaktoren	52
5.6 Analyse eines Casper3-GR Kontrollkonstrukts	56
5.7 Detektion von Nekrosen.....	58

5.8	Morphologie und Fluoreszenzverhalten der Zellen bei Apoptosen und Nekrosen	66
5.9	Verhalten beim Abtöten mehrerer Zielzellen	73
5.10	Untersuchung der Sequenzabfolge von Apoptose und Nekrose	84
5.11	Zytotoxische Vesikel als Nekrosemediatoren	90
5.12	Nekrosen / Apoptosen durch aufgereinigtes Perforin / Granzym im killerzellfreien System.....	98
5.13	Entwicklung einer Analyse­methode zur Klassifizierung und Visualisierung des Zelltods.....	104
5.14	Regulation des Apoptose- / Nekrosegleichgewichtes.....	109
5.15	Portierung des Casper3-GR Assay in 3D	115
6	Diskussion	124
6.1	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	124
6.2	Diskussion der Ergebnisse im Kontext aktueller Forschung / Ausblick...	130
7	Anhang.....	137
7.1	Veröffentlichungen.....	137
7.2	Abbildungsverzeichnis	138
7.3	Tabellenverzeichnis	141
7.4	Literaturverzeichnis	142
8	Danksagung.....	148
9	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Zusammenfassung

Einleitung: Natürliche Killerzellen (NK) sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie töten infizierte oder entartete Zielzellen, indem sie eine Immunologische Synapse bilden (IS) und entweder Todesrezeptoren (Fas-Ligand CD95 und Fas-Rezeptor CD178) koppeln oder Perforin und Granzyme aus Vesikeln freisetzen. Das Koppeln der Rezeptoren aktiviert in den Zielzellen eine Selbsttötungskaskade (Apoptose). Perforin kann sowohl die direkte Lyse der Zielzelle verursachen (Nekrose), als auch Granzym B in die Zielzelle einbringen, wodurch die Selbsttötungskaskade aktiviert wird (Apoptose). Sowohl die Apoptose- als auch Nekroseinduktion durch NK-Zellen ist in der Literatur beschrieben, jedoch werden die Prozesse isoliert oder nur populationsweit anhand von Endpunktassays untersucht. Dementsprechend ist die dynamische Regulation sowohl auf der auslösenden NK-Zellseite als auch auf der Zielzellseite bislang unbekannt.

Ergebnisse: Um die Prozesse in ihrem Verlauf und auf Einzelzellebene zu analysieren, wurde ein Assay entwickelt, in dem einheitliche, einen Zelltodsensoren exprimierende Zielzellen von primären, humanen NK-Zellen abgetötet werden. Die eindeutige Klassifikation von Apoptosen und Nekrosen durch unterschiedliche Fluoreszenzmuster des Sensors wurde etabliert. Die relative und absolute Häufigkeit von Apoptose und Nekrose wurde bestimmt sowie Zwischenformen identifiziert. Interessanterweise ist die Reihenfolge von Apoptose und Nekrose durch NK Zellen nicht randomisiert, sondern folgt bestimmten Mustern. Die überwiegende Mehrheit der NK (80,8%) beginnt mit Nekrosen. Die Hälfte dieser Zellen wechselt nach anfänglichen Nekrosen zu Apoptosen. Diese Modus-wechselnden NK-Zellen sind die effizientesten Killer. Nur ein geringer Teil (15,1 %) löst von Beginn an Apoptosen aus. Der Beginn mit Apoptosen und Wechsel auf Nekrosen ist selten (4,1 %).

Detaillierte quantitative Analysen zeigen, dass das Abtöten mehrerer Zielzellen ausschließlich sequenziell (eine Zielzelle nach der anderen) stattfindet, wenn es durch lytische Vesikel initiiert wird. Die durch das MTOC koordinierten Vesikel werden dabei jeweils zur IS lokalisiert. Die rezeptorbasierte Abtötung von Zielzellen durch Fas-FasL Interaktion kann hingegen parallel erfolgen, da der Fas-Ligand nicht an die Lokalisation der IS gebunden ist und in der Membran der NK-Zelle dispers verteilt werden kann.

Um die konzentrationsabhängige Dynamik von Perforin und Granzym B bezüglich Apoptose und Nekrose quantitativ zu analysieren, wurde ein kellerzellularer Assay etabliert, in dem die Balance der Nekrose- und Apoptoseinduktion in Abhängigkeit verschiedener Perforin- und Granzym B- Konzentrationen analysiert wurde. Ohne Perforin löst Granzym B nur in sehr hohen Konzentrationen eine nur geringe Zahl Apoptosen aus. Wird Granzym B gemeinsam mit Perforin appliziert, steigt die Zahl der Granzym B-induzierten Apoptosen. Gleichzeitig löst Perforin konzentrationsabhängig Nekrosen aus. Die Wahl des Verhältnisses und der Konzentration von Perforin und Granzym B steuert das Verhältnis von Apoptose und Nekrose.

Die Induktion von Apoptose und Nekrose durch NK-Zellen konnte auf 4 Arten voneinander isoliert werden. 1. Pharmakologisch durch Concanamycin A (CMA). CMA führt zur Degradation des Perforin in den Vesikeln durch Anheben des pH. Perforin-induzierte Nekrosen werden verhindert 2. Blockieren des Fas-Liganden durch Antikörper. Der Fas-Ligand ist kompetitiv blockiert, kann keine Apoptosen durch Rezeptorkoppelung initiieren. 3. Zielzellen ohne Fas. Das Fehlen des Rezeptors verhindert Apoptosen analog zum Block des Liganden. 4. Calciumabhängigkeit des Perforin. Perforin kann ohne extrazelluläres Calcium nicht in die Zielzellmembran inserieren.

Im letzten Schritt der Arbeit wurde der Assay in 3D etabliert, um in der Zukunft 3D Tumormodelle zu analysieren. Dabei wurde das Abtöten der Zielzellen durch NK-Zellen in einer Kollagenmatrix mittels Lichtblattmikroskopie untersucht und die Auswertung der dreidimensionalen Daten etabliert. Die 2D Daten wurden qualitativ in 3D bestätigt.

Ausblick: Die etablierten Assays haben neue Einblicke in die quantitativen Abläufe NK-vermittelter Apoptose und Nekrose in 2D und 3D ermöglicht. In der Zukunft können die Assays genutzt werden, um den Einfluss molekularer Prozesse auf die zytotoxische Aktivität menschlicher NK-Zellen z.B. bei tumorbiologischen Fragestellungen zu untersuchen.

2 Summary

Introduction: Natural killer (NK) cells are part of the innate immune system. They form an immune synapse (IS) with infected or tumorigenous target cells and kill them either by death receptors (Fas ligand CD95 and Fas receptor CD178) or by release of perforin and granzyme from lytic granules. Fas-FasL coupling induces apoptosis. Perforin release can either initiate direct lysis of target cells (necrosis) or help granzymes enter target cells to induce apoptosis. Both NK-dependent target cell apoptosis and necrosis have been described in the literature, however only the analysis of whole populations by endpoint assays have been carried out. The dynamic regulation of NK-dependent apoptosis and necrosis of target cells at the single cell level has not been studied.

Results: To investigate dynamic single cell processes, target cells with a stably incorporated cell death sensor were established which can be killed by human NK cells. The assay allows the explicit classification of single cell apoptosis and necrosis by different fluorescence patterns of the sensor. Quantitative analysis revealed the relative and absolute number of apoptotic and necrotic target cell death as well as mixed forms. Interestingly, it was found that the order of apoptosis and necrosis induced by single NK cells was not random but followed certain patterns. Most NK cells (80.8 %) start by killing target cells by necrosis and half of them switch eventually to apoptotic killing. These mode-changing NK cells are the most efficient killers. Only 15.1 % of NK cells start with apoptosis and changing from apoptosis to necrosis is rare, only 4.1 % of NK cells show this pattern.

Detailed quantitative analyses show that NK cells kill only sequentially (one target cell after the other) if death is induced only by the release of lytic granules. In this case lytic granules are located exclusively to the IS and are coordinated by the MTOC. Parallel killing is however possible if Fas-FasL killing is also used because FasL localization is not restricted to the IS.

For the analysis of concentration-dependent dynamics of perforin- and granzyme B-dependent apoptosis and necrosis, a killer cell-free assay was established which allows the quantification of apoptosis and necrosis as a function of different perforin and granzyme B concentrations. With no perforin present, granzyme B can induce apoptosis, but only in very few cells and at very high concentrations. With increasing perforin

concentrations, the number of granzyme B-induced apoptotic target cells increases. In parallel, perforin is able to induce necrosis in target cells in a concentration dependent manner. The ratio between perforin and granzyme B controls the ratio of necrosis to apoptosis.

Four different experimental conditions could be established to isolate apoptosis and necrosis. 1.) At low concentrations, concanamycin A is able to degrade perforin in lytic granules by increasing pH. Thereby, perforin-induced necrosis is blocked. 2.) Inhibition of FasL through antibodies reduces Fas-FasL-induced apoptosis. 3.) Target cells without Fas are not killed by Fas-receptor dependent apoptosis. 4.) Perforin-dependent induction of target cell death is calcium dependent. With no external calcium present, perforin dependent necrosis was blocked.

In the last part of the present work, the 2D assay was transferred into a 3D environment to allow the analysis of physiologically more relevant tumor models in the future. For that, NK dependent induction of target cell death was analyzed in a 3D collagen matrix with lightsheet microscopy. Analysis of the 3D data confirmed at least qualitatively the findings from 2D experiments.

Outlook: The established assays have provided new insights into NK-mediated apoptosis and necrosis of target cells in 2D and 3D. In the future, the assays could be used to investigate the influence of molecular processes for cytotoxic activity of human NK cells, for instance in tumor cell biology.

3 Einleitung

3.1 Natürliche Killerzellen

Wir leben in einer Umgebung voller Mikroorganismen und sind diesen von Geburt an ausgesetzt. Viele dieser Organismen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) lösen Krankheiten aus. Dennoch werden wir selten krank, sind im Falle einer Infektion meist in der Lage das aufgenommene Pathogen zu besiegen und bauen sogar eine temporäre Immunität auf (Murphy 2011). Ermöglicht wird dies durch das Immunsystem, dass in einen angeborenen und einen adaptiven Bereich gegliedert wird. Während die Zellen des adaptiven Immunsystems (antikörperproduzierende B-Zellen, vermittelnde $CD4^+$ T-Helferzellen, abtötende $CD8^+$ T-Killerzellen etc.) spezifisch auf Pathogenfragmente reagieren, erkennen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) des angeborenen Immunsystems die stressbedingte Fehlregulation von Oberflächenrezeptoren pathogenbefallener Zellen. Das adaptive Immunsystem ist in der Lage das Pathogen spezifisch und final zu bekämpfen, benötigt zu Beginn der Infektion jedoch Zeit um das Pathogen zu erkennen und die reaktiven Abwehrzellen zu expandieren. Wäre der Körper in dieser Initialphase schutzlos, könnten sich schnell replizierende Pathogene derart vermehren, dass er nicht in der Lage wäre die Menge an Pathogenen zu bewältigen. Das angeborene Immunsystem stellt eine sofort verfügbare Grundabwehr, die nach Infektion die Vermehrung des Pathogens eindämmt und den Zellen des adaptiven Immunsystems die notwendige Zeit verschafft, sich auf das Pathogen einzustellen. Erreger, die im Zusammenspiel beider Immunsystemzweige abgewehrt werden, können ohne die Eindämmung durch das angeborene Immunsystem letal sein (Orange 2002). Die sofortige Einsatzbereitschaft der NK-Zellen wird nicht dadurch erreicht, dass sie spezifisch auf präsentierte Pathogenfragmente reagieren, sondern auf zelluläre Stresssignale. Um diese zu identifizieren, binden NK-Zellen an die Oberfläche der zu überprüfenden Zelle und koppeln Rezeptoren. Die Rezeptoren der Zielzelle können aktivierend und inaktivierend auf die NK-Zelle wirken (Vivier et al. 2008). Wie bei einem Reißverschluss wird eine Vielzahl von Rezeptoren überprüft. Ist die Mehrheit inaktivierend, löst die NK-Zelle den Kontakt. Ist die Mehrheit aktivierend, wird die NK-Zelle aktiv und tötet die Zielzelle ab.

Auch das Fehlen standardmäßig exprimierter Rezeptoren, beispielsweise MHC-I, aktiviert NK-Zellen. MHC-I präsentiert Pathogenfragmente, wodurch die adaptive Immunabwehr aktiviert wird. Einige Viren (bspw. Cytomegalovirus und Herpes Simplex Virus) umgehen dieses System, indem sie ihren Befall durch Herabregulation der MHC-I Expression maskieren. Auf diese Weise veränderte Zellen entgehen der adaptiven Immunität, jedoch nicht der angeborenen. Da NK-Zellen nicht auf die Pathogenpräsentation angewiesen sind, sondern das Fehlen des MHC-I Rezeptors als aktivierendes Signal erkennen, töten sie die maskierten, virenbefallenen Zellen (Lodoen and Lanier 2005).

Teilen sich entartete Zellen unkontrolliert, entsteht Krebs. Fehler in der DNA-Replikation werden in diesen Zellen nicht mehr korrigiert, da zellinterne Kontrollmechanismen ausgefallen sind. Verändert das unkontrollierte Zellwachstum ebenfalls die Rezeptorexpression, aktiviert dies die NK-Zellen. Sie werden aktiv und töten die veränderte, körpereigene Zelle ab (Ljunggren and Malmberg 2007). Aktuelle immuntherapeutische Behandlungsansätze gegen Krebs bestehen darin, Krebszellen für NK-Zellen erkennbar zu machen (Pescovitz and Pescovitz 2006). Um die Behandlungsmöglichkeiten zu erweitern wird daran geforscht, patienteneigene Immunzellen zu entnehmen, sie bestmöglich zu aktivieren und anschließend zu reinfundieren (Dahlberg and Alici 2015).

3.2 Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

Zielzellen können auf verschiedene Arten sterben. Die grundverschiedensten Pole dieser Skala sind die Apoptose und die Nekrose. Sie unterscheiden sich in dem auslösenden Mechanismus, den intern ablaufenden Prozessen, der Morphologie während des Zelltodes und der benötigten Zeit vom Zell-Zellkontakt bis zum Zielzelltod.

Die Apoptose kann über drei verschiedene Signalwege ausgelöst werden, dem extrinsischen (Ligand-Rezeptorbindung), dem intrinsischen (Aktivierung durch Zellstress oder -schäden) und dem Granzym-B Signalweg (Taylor, Cullen, and Martin 2008). Jeder dieser Signalwege führt zur Aktivierung von cysteinyl-aspartat spezifischen Proteasen, den Caspasen. Diese schneiden in dem für sie spezifischen Aminosäureerkennungsmotiv c-terminal vor dem zweiten Aspartat und tragen ein Cystein in ihrer Bindestelle (Fang et al. 2006). Sie liegen in den Zellen als Pro-Caspasen, also als inaktive Vorformen, vor.

Initiatorcaspasen (bspw. Caspase-8, Caspase-9) werden durch Protein-Protein Interaktionen aktiviert (gegenseitige Katalyse durch adapterproteinvermittelte Annäherung oder Holoenzymbildung und Autokatalyse nach Konformationsänderung), Effektorcaspasen durch Spaltung von im Signalweg vorgeschalteten, bereits aktivierten Caspasen (Caspasekaskade) oder Granzym B, einer aus den Granula der Immunzellen freigesetzten Protease (Hengartner 2000; Taylor, Cullen, and Martin 2008).

Die aktiven Effektorcaspasen sind proteolytisch und schneiden Proteine, deren Aminosäuresequenz die Caspasebindestelle trägt. Hierbei spalten sie Proteine des Zellmetabolismus (Lüthi and Martin 2007), verursachen die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran (Green and Reed 1998), zerstören die Kernmembran durch Laminazersetzung (Fischer, Jänicke, and Schulze-Osthoff 2003), aktivieren DNasen (Enari et al. 1998) und spalten die Zytoskelettbestandteile Actin und Myosin (Gerner et al. 2000). Die Summe dieser Prozesse führt zum geordneten Abbau der Zielzelle, da die Membrantegrität stets erhalten bleibt, obwohl die DNA fragmentiert, Proteine gespalten, Pseudopodia zurückgezogen und das Zellvolumen verringert wird (Kroemer et al. 2009). Typisch für die Apoptose ist das Blebben der Membran, was durch die Zersetzung des Zytoskeletts hervorgerufen wird, während gleichzeitig das Zytosol von Innen gegen die intakte, aber ungestützte Zellmembran presst (Taylor, Cullen, and Martin 2008). Durch den kontrollierten Ablauf der Apoptose werden Schäden an benachbarten Zellen im Zellverbund minimiert (Kerr J. F. R., Wyllie A. H. 1972). Die Reste der apoptotischen Zellen werden von Phagozyten und Dendritischen Zellen aufgenommen. Phagozyten zersetzen die Überreste in ihren Lysosomen, Dendritische Zellen präsentieren aufgenommene Antigene und stimulieren damit Zellen des adaptiven Immunsystems (Albert, Sauter, and Bhardwaj 1998).

Der komplementäre Pol zum Zelltod durch Apoptose ist die Nekrose. Bereits die Morphologie unterscheidet sich, denn während die Apoptose zu einem intakten, selbstverdauten Kompartiment führt, kommt es bei der Nekrose zu einer frühzeitigen Zerstörung der Zielzellmembran. Statt zu schrumpfen und sich selbst zu verdauen, platzt die nekrotische Zelle auf, das Zytoplasma und die Organellen werden freigesetzt, die umgebende Flüssigkeit dringt ein und die Zelle schwillt an (Kroemer et al. 2009).

Nekrosen werden durch das Zytolysin Perforin ausgelöst. Wird es auf Zellen appliziert, sterben diese durch Lyse (Ilia Voskoboinik et al. 2005). Die NK-Zelle speichert Perforin und Granzym B in zytotoxischen Vesikeln (Peters et al. 1991). Nach Bindung an eine Zielzelle werden die Vesikel an der immunologischen Synapse mit der NK-Zellmembran verschmolzen und der Inhalt in den immunologischen Spalt freigegeben (Ménager et al. 2007). Die exozytierten Stoffe diffundieren über den Spalt zur Ziellmembran. In Abhängigkeit von Kalzium lagert sich Perforin an die Ziellmembran an (Ilia Voskoboinik et al. 2005) und ermöglicht Granzym B den Zugang zur Zielzelle (Ilia Voskoboinik, Smyth, and Trapani 2006). Dieser Vorgang kann sowohl zur Nekrose als auch Apoptose der Zielzelle führen. Der zur Apoptose führende Signalweg ist in der Literatur oft beschrieben, die direkte, nekrotische Lyse hingegen selten.

Die Proteinstruktur des Perforins ist durch Röntgenkristallanalyse aufgeklärt (Law et al. 2010). Es besitzt eine C2-Kalziumbindedomäne, wodurch seine Anlagerung an die Ziellmembran von einer minimalen Kalziumkonzentration von 100µM abhängig ist (Ilia Voskoboinik et al. 2005). Der membraninserierende Molekülteil besitzt strukturelle Analogie zu C9 des Komplementsystems und wird als membrane-attack-complex-perforin-like (MACPF) bezeichnet (Dean et al. 2007). Durch Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass sich im Mittel 19 bis 24 Monomere zu einer Pore mit einem Lumen von 130 bis 200 Å zusammenlagern (Law et al. 2010). Auch wenn die Perforinporenbildung in der Zielzellmembran (Podack, Hengartner, and Lichtenheld 1991) und der Effekt der dosisabhängigen Lyse der Zielzellen unstrittig ist (Baran et al. 2009) ist der Mechanismus der NK-Zell induzierten Nekrose der Zielzelle in der Literatur nicht etabliert.

Ob die Exozytose zytotoxischer Vesikel zur Apoptose oder Nekrose führt, ist in Folge der aufgeführten Erkenntnisse abhängig von der Perforinkonzentration. Ist die Konzentration sublytisch, ist die Zelle in der Lage die Poren zu reparieren. In dieser Zeit dringt Granzym B perforinvermittelt in die Zielzelle ein und induziert deren Apoptose (Lopez et al. 2013). Eine höhere Perforinkonzentration führt zu einer höheren Zahl an Poren und somit vermehrtem Einstrom umliegenden Mediums in die Zielzelle sowie Ausstrom von Cytosol aus der Zelle. Wird der osmotische und mechanische Stress zu

groß, reißt die Membran. Die Zelle stirbt nekrotisch, bevor die Caspasekaskade durch Granzym B aktiviert werden kann.

Neben den stark unterschiedlichen Zelltodarten der Apoptose und Nekrose existieren Mischformen. Zum einen kann es während einer killerzellinduzierten Nekrose zur Aktivierung der Caspasekaskade kommen, wodurch in der aufgeplatzten, nekrotischen Zelle zusätzlich caspatische Zersetzungsvorgänge stattfinden. Zum anderen kann es nach vollendeter Apoptose zu einer Sekundärnekrose kommen, indem das final verdaute Kompartiment seine Membranintegrität verliert und aufplatzt.

Apoptosen und Primärnekrosen können morphologisch eindeutig unterschieden werden, Primärnekrosen und Sekundärnekrosen jedoch nicht. Sie werden zwar durch unterschiedliche Signalwege bzw. biochemische Ereignisse ausgelöst, der finale, morphologische Desintegrationsprozess ist jedoch gleich. Der Übergang einer Apoptose zu einer Sekundärnekrose ist rein durch das Kriterium des Cytosolverlustes nicht von einer Primärnekrose unterscheidbar. Endpunktassays sind daher nicht in der Lage die unterschiedlichen Zelltodarten zu klassifizieren (Vandenabeele et al. 2010). Zur Untersuchung zytotoxischer Mechanismen der Killerzellen auf Einzelzellebene ist es daher erforderlich einen Sensor zu etablieren, der die Zelltodarten klar unterscheidet und die Beobachtung auf Einzelzellebene über Zeit ermöglicht.

3.3 FRET-Sensor Casper3-GR und stabile Zielzelllinien

Um den Verlauf des Zielzelltodes eindeutig zu klassifizieren wird der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-Sensor Casper3-GR eingesetzt (Evrogen 2008). Das Funktionsprinzip dieses Sensors ist die Energieübertragung zwischen zwei Fluophoren in räumlicher Nähe unter 10 nm (Förster 1948; Patterson, Piston, and Barisas 2000). Die Energieübertragung ist strahlungsfrei, findet also nicht in der Form emittierter und absorbierter Photonen statt, sondern wird direkt zwischen den fluoreszenten Dipolen übertragen.

Das in seiner Anregung kurzwelligere Fluophor ist der Donor. Die Anregung des Donors führt durch die Stokes-Verschiebung zu einer langwelligeren Emission. Überlappt das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors und befin-

den sich beide Fluophore in direkter Nachbarschaft unter 10 nm, wird ein Teil der Donorfluoreszenzenergie durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen direkt auf den Akzeptor übertragen. Dieser wird dadurch angeregt und fluoresziert. Werden die Fluophore räumlich voneinander getrennt (> 10 nm), wird die Energie des angeregten Donors nicht mehr direkt auf den Akzeptor übertragen und dessen Fluoreszenz erlischt. Die FRET-Effizienz ist hierbei in der sechsten Potenz vom Abstand beider Fluophore abhängig (Piston and Kremers 2007). Neben dem Verlust der Akzeptorfluoreszenz steigt die Intensität der Donorfluoreszenz an, da dieser keine Energie mehr auf den Akzeptor überträgt (Quenching) und die gesamte Emissionsenergie nun in Form von Fluoreszenz sichtbar wird.

Der Sensor besteht aus den Fluophoren TagGFP und TagRFP. Die Fluophore sind verbunden über eine Peptidverbindung aus 17 Aminosäuren, die die Caspase-3 Erkennungssequenz DEVD enthält (Shcherbo et al. 2009). Durch Transfektion wird der Sensor als DNA-Vektor in die Zellen eingebracht und konstitutiv exprimiert. Er akkumuliert im Zytosol und führt zu einer gleichmäßigen Fluoreszenz in der Zelle.

Wird in der transfizierten Zelle die Apoptosekaskade und damit Caspase-3 aktiviert, spaltet diese neben zellulären Komponenten ebenfalls den FRET-Sensor, da Caspase-3 die DEVD-Sequenz der Peptidverbindung schneidet und dadurch die beiden Fluophore trennt. Die nun ungekoppelten, für sich gesehen intakten Fluophore entfernen sich durch Brown'sche Molekularbewegung voneinander, wodurch die Fluoreszenz des Akzeptors sinkt und die des Donors steigt.

Um die Zustandsänderung des Sensors zu detektieren, werden mindestens zwei, im Optimalfall drei Fluoreszenzkanäle gemessen. Dies sind der Donor-, der Akzeptor- und der FRET-Kanal. Im Donor-Kanal (TagGFP, Exzitation 482 nm, Emission 505nm) wird das Unquenching detektiert. Wird der Sensor geschnitten, steigt die Donorfluoreszenzintensität durch die räumliche Trennung der Fluophore. Im Akzeptor-Kanal (TagRFP, Exzitation 555 nm, Emission 584 nm) wird gemessen, ob der Sensor über den Messzeitraum bleicht. Da der Akzeptor nicht durch Quenching beeinflusst wird und sich die Konzentration auch bei geschnittenem Sensor nicht verändert, ist die Minderung seiner Fluoreszenz über die Zeit ein Maß für photoinduziertes Bleichen. Gleichzeitig verursacht das Messen dieser Kontrolle zusätzliches Bleichen und Phototoxizität. Zur Dar-

stellung des Sensoroutputs ist der Bleichkanal nicht zwingend erforderlich. Daher kann auf dessen Detektion verzichtet werden, wenn es durch experimentelle Restriktionen der Aufnahmegeschwindigkeit oder Zellvitalität indiziert ist.

Im FRET-Kanal wird der Donor angeregt (Tag GFP Exzitation 482 nm) und die Emission des Akzeptors (RFP Emission 584 nm) gemessen. Die Fluoreszenzintensität dieses Kanals fällt, wenn das Konstrukt geschnitten wird.

In einer vitalen Zelle ohne Bleichen sind die Fluoreszenzintensitäten aller Kanäle konstant. Erzeugt man ein Overlay des Donor- und FRET-Kanals und kodiert die Farbkanäle mit einer den Emissionswellenlängen entsprechenden Lookup-Table (LUT), haben vitale Zellen durch den Overlay der grünen GFP-Fluoreszenz und der roten FRET-Fluoreszenz ein oranges Signal.

Wird die Zelle apoptotisch, spaltet Caspase-3 den Sensor. Die GFP-Fluoreszenzintensität steigt durch Unquenching, die FRET-Fluoreszenzintensität sinkt durch die Dispersion der getrennten Fluophore. Im Overlay steigt der grüne Farbanteil, der rote fällt. Apoptotische Zellen haben daher ein grünes Fluoreszenzsignal. Stirbt die Zelle nekrotisch, werden keine Caspasen aktiviert. Der Sensor wird nicht geschnitten, die Fluoreszenzen des Donor- und FRET-Kanals verschieben sich nicht gegeneinander. Durch die Membrandisruption kommt es zum schlagartigen Zytosolverlust bei gleichzeitigem Einstrom des umgebenden Mediums. Charakteristisch für die Nekrose ist der schlagartige Verlust der Fluoreszenzintensität sämtlicher Kanäle.

Die Quantifizierung des Sensorsignals erfolgt durch Berechnung des Donor-Ratios, indem nach Hintergrundabzug, Bleichkorrektur und Normierung auf den Anfangswert der Quotient der FRET-Fluoreszenzintensität geteilt durch die Donorfluoreszenzintensität gebildet wird. In der vitalen Zelle sind die Fluoreszenzsignale konstant, das Ratio ist 1. Wird der Sensor während der Apoptose geschnitten, fällt das Ratio, da die FRET-Fluoreszenz (Zähler) sinkt und die Donor-Fluoreszenz steigt (Nenner).

Um die Quantifizierbarkeit der Einzelzellbeobachtungen zu optimieren, werden monoklonale, stabile Zielzelllinien benötigt. Transiente Transfektionen liefern je nach Zellart im Mittel 10-50 Prozent nutzbare Zellen unterschiedlicher Expressionslevel und Vitalität. Die Zellen stabiler Linien hingegen exprimieren das Konstrukt einheitlich und sind

vital. Jurkat E6-1 und K562 sind etablierte NK-Zielzellen, die aufgrund der Fehlregulation ihrer Rezeptorexpression erkannt und abgetötet werden. Somit sind alle Zellen stabiler Linien dieser Zelltypen als Zielzellen für NK-vermittelte Zytotoxizität verwendbar. Durch die fehlende CD95-Expression der K562 Zellen wird zudem der durch den Fas-Rezeptor vermittelte Signalweg ausgeschaltet und die Untersuchung der vesikelvermittelten Zytotoxizität vereinfacht.

3.4 Ziel der Arbeit

1972 wurde in tierischen Zellen eine Zelltodart entdeckt, die als homöostatischer, geweberegulierender Prozess charakterisiert und als Apoptose bezeichnet wurde (Kerr J. F. R., Wyllie A. H. 1972). Der Prozess wurde im Modellorganismus *C. elegans* untersucht und seine kontrollierende Funktion in der Gewebeentwicklung detailliert nachgewiesen (Lettre and Hengartner 2006). Das Verständnis der Nekrose hingegen entwickelte sich weniger gradlinig. In den 1980er Jahren wurde postuliert, dass Immunzellen ausschließlich Apoptosen verursachen und Nekrosen durch C9 des Komplementsystems ausgelöst würden (Duvall and Wyllie 1986). In Veröffentlichungen der 1990er Jahre wurde die Existenz NK-Zell induzierter Nekrosen beschrieben, jedoch erfolgen die Untersuchungen ausschließlich durch Endpunktassays und auf Populationsebene (Honda and Miyazaki 1996; Kataoka et al. 1996). Die Funktion von Perforin als Mediator kontrollierter Zytotoxizität durch Immunzellen wird bis heute kontrovers diskutiert, es bestehen Unklarheiten hinsichtlich der Größe der Perforinporen sowie des Mechanismus der perforinvermittelten Granzymtransduktion (Ilia Voskoboinik, Whisstock, and Trapani 2015). Ein wesentlicher Schritt in der Analyse immunologischer Zytotoxizität ist die populationsweite Untersuchung der Prozesse über Zeit anstelle von Endpunktassays (Kummerow et al. 2014). Das zytotoxische Verhalten auf Einzelzellebene und das Zusammenspiel von Apoptosen und Nekrosen als Gesamtrepertoire immunologischer Zytotoxizität ist bislang nicht beschrieben.

Ziel der Arbeit ist es, einen apoptose- und nekrosesensitiven Assay auf Einzelzellebene zu etablieren, um zu untersuchen, ob Nekrosen zum natürlichen Repertoire der NK-Zellen gehören. Es soll geklärt werden, warum NK-Zellen bei identischen Zielzellen unterschiedliche Zelltode auslösen, wovon die Wahl des Abtötungsmodus abhängig ist,

ob die Auswahl des Abtötungsmodus beeinflussbar ist, ob die Induktion von Apoptosen und Nekrosen zufällig oder nach festen Mustern erfolgt und welchen Einfluss mögliche Muster auf die Effizienz der NK-Zelle haben.

Neben der Analyse des Zytotoxizitätsverhaltens der NK soll ein möglichst physiologisches Modellsystem geschaffen werden, dass es erlaubt, die gewonnenen Informationen in Zukunft mit tumorbiologischen Fragestellungen zu verknüpfen.

4 Material und Methoden

4.1 allgemeiner Laborbedarf

Nicht näher aufgeführte Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen BD Biosciences, Eppendorf, Invitrogen, Lonza, Roth, Sigma, VWR sowie Qiagen bezogen.

Tabelle 1: Allgemeiner Laborbedarf, allgemeine Laborgeräte

Produkt	Hersteller	Produktnummer
24-Well-Platte	BD Biosciences	353047
384-Well-Platte	Greiner Bio One	781091
6-Well-Platte	BD Biosciences	353046
96-Well-Platte	BD Biosciences	353948
Brutschrank	Thermo Scientific	51026402
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Biorad	185-5485
FACSCanto II™	BD Biosciences	ohne
FACSVerse™	BD Biosciences	ohne
Nucleofector II	Lonza	ohne
Pipettierhilfe	Integra	155017
Sterilpipetten	BD Biosciences	357525
Zellkulturflaschen	BD Biosciences	353108
Zellzähler Z2	Beckman Coulter	383550
Zentrifuge 5418	Eppendorf	5401000017

Tabelle 2: Zellen

Zellen	Lieferant	Produktnummer
K562	Onkologie, Prof. Dr. Pfreundschuh	ohne
K562 pCasper	selbst generiert	ohne
NK-Zellen	Spender der UKS Blutbank	ohne
NK92	ATCC	CRL-2407
Jurkat E6-1	ATCC	TIB-152™
Jurkat E6-1 pCasper	selbst generiert	ohne

Tabelle 3: Mikroskopzubehör und -komponenten

Produkt	Hersteller	Spezifikationen
μDish, 35mm high	Ibidi	81156
Aluminiumadapter	Eigenbau	Innendurchmesser: 25 mm, Außen passend in Heizmodul der Stage
Cell Observer	Zeiss	ohne
Colibri	Zeiss	LED Module: 365nm, 470nm, neutral weiß mit Ex 560/40 aus Filterset 45
Coverslips 25mm	Kindler	1,5 μm
DMI 6000 B	Leica	ohne
Filter Set 38 HE	Zeiss	Ex 470/40

		FT 495 BP 525/50
Filter Set 45	Zeiss	Ex 560/40 FT 585 Em 630/75
Filterset 38 Endow GFP	Zeiss	EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50
Filterset 45 HQ TexasRed	Zeiss	EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75
Kamera AxioCam MRm	Zeiss	2/3" CCD-Chip, 12bit, 1388x1040, 6,45x6,45 µm Pixelgröße
Lightsheet Z.1	Zeiss	ohne
LS Filter module	Zeiss	GFP EF BP 525/40 SBS LP 560 RFP EF BP 600/30
Pathway 855 Bioimager	BD	Ohne

Tabelle 4: Lösungen, Kulturmedien, Farbstoffe, Probenvorbereitung, Inkubation

Produkt	Hersteller	Produktnummer
AIM V®	ThermoFisher	12055091
Bovine Serum AlbuminBSA	Sigma-Aldrich	A-9418-50G
BSA Puffer	selbst hergestellt (Enzo Life Sciences 2015b)	2 ml 1 M HEPES Stock 5 ml 3 M NaCl Stock ad 50 ml H2O dd 1 g BSA pH 7.4 ad 100 ml H2O dd
Calcein AM	ThermoFisher	C3100MP
DMSO	Sigma	D4540
DPBS	ThermoFisher	14190-169
Dynabeads® Untouched™ Human NK Cells isolation kit	Invitrogen	11349D
Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved	life technologies	10270-106
Fibronectin	Sigma	F1141
Foetal Bovine Serum	Invitrogen	10270-106
Fura-2 AM	Invitrogen	F1221
Granzyme B (human)	Enzo	ALX-200-602-C010
Hepes	Sigma	H3375
Hoechst 33342	ThermoFisher	H1399
Kalziumpuffer 2,5 mM	selbst hergestellt (Enzo Life Sciences 2015b)	5 ml 3 M NaCl Stock 0,25 ml 1 M CaCl2 Stock 2 ml 1 M HEPES Stock pH 7.4 ad 100 ml H2O dd
Kollagen	AdvancedBiomatrix	5010-50ML
LysoTracker® Red DND-99	ThermoFisher	L7528
PBS	Gibco	70011-036
Penicillin / Streptomycin	ThermoFisher	15140122
Perforin (human)	Enzo	ALX-200-604-C001
Poly-L-ornithine	Sigma-Aldrich	P3655

Propidium Iodid	Invitrogen	P3566
Ringer-Lösung 0 mM CaCl ₂	selbst hergestellt Hersteller der Stock- lösungen: Merck J. T. Baker Sigma	155 mM NaCl 4,5 mM KCl 10 mM Glucose 5 mM Hepes 3 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA pH 7,4 (1 N NaOH)
Ringer-Lösung 0,5 mM CaCl ₂	selbst hergestellt Hersteller der Stock- lösungen: Merck J. T. Baker Sigma	155 mM NaCl 4,5 mM KCl 10 mM Glucose 5 mM Hepes 2,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ pH 7,4 (1 N NaOH)
Ringer-Lösung 1 mM CaCl ₂	selbst hergestellt Hersteller der Stock- lösungen: Merck J. T. Baker Sigma	155 mM NaCl 4,5 mM KCl 10 mM Glucose 5 mM Hepes 2 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ pH 7,4 (1 N NaOH)
RPMI 1640	Invitrogen	21875-034
RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep	selbst angesetzt	ohne
Staurosporine from Strepto- myces sp.	Sigma-Aldrich	S4400 1MG
TetraSpeck™ Microspheres	ThermoFisher	T-7279

Tabelle 5: Antikörper, Plasmide, Primer, Molekularbiologie

Produkt	Hersteller	Produktnummer
Anti-Human CD16 FITC	eBioscience	11-0168-42
Anti-Human CD178	BD	556375
Anti-Human CD3-FITC	Biolegend	300306
Anti-Human CD4 PE	eBioscience	25-0049-41
Anti-Human CD56 PE	Biolegend	355504
Anti-Human CD62L FITC	eBioscience	11-0629-42
Anti-Human CD69 PE	eBioscience	12-0699-41
Anti-Human CD8a APC	eBioscience	17-0087-42
Anti-Human CD95 APC	Biolegend	305611
Anti-Human CD95 Apo 1-1	Enzo Life Sciences	ALX-805-022-C100
Anti-Human Perforin APC	Biolegend	308111
Mouse IgG1 APC Isotype CTRL	Biolegend	305612
Mouse IgG1 FITC Isotype CTRL	Biolegend	400108
Mouse IgG2a PE Isotype CTRL	Biolegend	400214
Nucleofector Kit V	Lonza	VCA-1003
Primer BAN1033 QC caspase cleavage site forward (pCas- per: DEVA)	MWG-Biotech AG	5'-CAG CGG TGA CGA GGT CGC CGG TAC CTC AGT CGC CAC-3'
Primer BAN1034 QC caspase	MWG-Biotech AG	5'-GTG GCG ACT GAG GTA CCG GCG

cleavage site reverse (pCasper: DEVA)		ACC TCG TCA CCG CTG-3'
Primer CD95 BAN867	MWG-Biotech AG	5'-TGG AAG AAA AAT GGG CTT TG-3'
Primer CD95 BAN868	MWG-Biotech AG	5'-CAA GGG ATT GGA ATT GAG GA-3'
Primer CD95 BAN869	MWG-Biotech AG	5'-ATG GGC TTT GTC TGT GTA CTC CT-3'
Primer CD95 BAN870	MWG-Biotech AG	5'-GTC CAA AAG TGT TAA TGC CCA AGT-3'
QuantiTect SYBR® Green PCR	Qiagen	204145
SuperScript® II Reverse Transcriptase	life technologies	18064-014
TagGFP-N	Evrogen	FP122
TagRFP-N	Evrogen	FP142
TRIzol®	life technologies	15596-026

4.2 Erläuterung wichtigster Materialien, Geräte und Programme

Staurosporin

Das aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isolierte Antibiotikum inhibiert eine Vielzahl von Kinasen und aktiviert den über bcl-2 regulierten Apoptosepathway (Cory and Adams 2002; Invitrogen 1981).

G418

Das vom Bakterium *Micromonospora rhodorangea* produzierte Antibiotikum verhindert die Polypeptidsynthese durch Blockieren des Elongationsschrittes in pro- und eukaryotischen Zellen durch Interferenz mit den 80s Ribosomuntereinheiten. (Invitrogen 2001).

Concanamycin A

Das Antibiotikum wird von der Bakteriengattung *Streptomyces* hergestellt und ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolären Protonenpumpe. Der Anstieg des vakuolären pH führt zur Degradation von Perforin (Kataoka et al. 1996).

Interleukin-2

IL-2 ist ein Protein, dass die Proliferation von Immunzellen stimuliert und Immunantworten reguliert (Brehm et al. 2011; Invitrogen 2011b).

Poly-L-Ornithin

Poly-L-Ornithin ist eine positiv geladene, synthetische Aminosäurekette, die die Zelladhäsion an Plastik und Glasoberflächen verstärkt (AdvancedBioMatrix 2015b).

Fibronectin

Zelluläres Fibronectin ist ein Adhäsions-Glykoprotein der extrazellulären Matix. Das aus Rinderserum gewonnene Fibronectin wird zur Beschichtung von Glas- und Plastikoberflächen genutzt und ermöglicht die Adhäsion und Migration von Zellen auf diesen Oberflächen (Sigma-Aldrich 2007).

Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein des Bindegewebes und bildet im polymerisierten Zustand eine dreidimensionale Umgebung, in der Zellen migrieren können. Kollagen (Nutragen®, Advanced BioMatrix) wird von Rindern aus einer kontrollierten Zucht gewonnen, besteht zu 97 % aus Typ I und 3 % Typ III (AdvancedBioMatrix 2015a).

Jurkat E6-1

Die aus einer T-Zell Leukämie hervorgegangene, immortalisierte Suspensionszelllinie ist aufgrund ihrer Oberflächenrezeptorexpression eine Standardzielzelllinie für NK-Zellen (ATCC 2015; Aubry et al. 1999).

K562

Die Suspensionszelllinie ist aus dem Lymphoblast einer chronisch myelotischen Leukämie entstanden. K562 sind eine etablierte Standardzielzelllinie für NK-Zellen (ATCC 1994; Pross and Maroun 1984).

Stabile Zelllinien K562 pCasper und Jurkat pCasper

Die Suspensionszelllinien Jurkat E6-1 und K562 wurden mit dem Plasmid Casper3-GR der Firma Evrogen transient transfiziert und nach Monoklonalisierung durch Verdünnung unter G418 Selektion selektioniert.

NK-92

NK-92 ist eine aus einem Lymphom entstandene Zelllinie. Analog zu primären NK Zellen sind NK-92 zytotoxisch gegen K562 und Jurkat Zielzellen.

Fura2-AM

Der ratiometrische Farbstoff wird von den Zellen als membrangängiger Ester durch Diffusion aufgenommen und im Zytosol durch Esterasen gespalten und polarisiert. Nach Spaltung ist er nicht mehr membrangängig und reichert sich im Zytosol und zum

Teil in den Organellen an. Je nach Calciumbindung ändert der Farbstoff die Maxima seines Exitationsspektrums. In der Anregung existiert ein isosbestischer Punkt bei 360nm, hier ist die Gesamtaborption des Farbstoffes unabhängig vom Zustand der Calciumbindung (Invitrogen 2011a).

LysoTracker® Red DND-99

Der Farbstoff besteht aus einem Fluophor (Exitation 570nm, Emission 590 nm), gekoppelt an eine schwache Base, die in neutralem pH schwach protoniert ist. Der Farbstoff ist membrangängig und selektiv für saure Zellkompartimente. Die chemische Grundlage des Anreicherungsprozesses in den sauren Kompartimenten ist nicht abschließend geklärt, wahrscheinlich sind Protonierungs- und Einlagerungsprozesse in die Membran der sauren Kompartimente Grundlage der Fluoreszenzakkumulation (Invitrogen 2007).

Calcein-AM

Calcein-acetoxymethylester ist ein membrangängiger Farbstoff (Exitation 495 nm, Emission 515 nm), der nach Diffusion durch die Zellmembran durch cytosolische, unspezifische Esterasen gespalten wird. Das nach Spaltung hydrophile Calcein ist nicht membrangängig und akkumuliert somit im Cytosol und zum Teil in den Organellen. (Tenopoulou et al. 2007)

Zeiss Cell Observer

Der Cell Observer ist ein Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, das zur vollautomatisierten Beobachtung von Zellen auf Einzelzelebene unter brutschrankähnlichen Inkubationsbedingungen geeignet ist. Durch CO₂ Begasung und Temperaturregulation können optimierte Wachstumsbedingungen für Zellen aufrecht gehalten werden, während Aufnahmen in mehreren Fluoreszenzkanälen an mehreren, vordefinierten Positionen durchgeführt werden. Zur Nutzung des Setups für FRET-Messungen ist es zwingend erforderlich die Anordnung der Filter zu verändern. Standardmäßig werden der Anregungs- und Emissionsfilter sowie der dichroide Spiegel in einem Filterwürfel zusammengefasst. Bei FRET-Messungen muss jedoch das Donorfluophor angeregt und die Emission des Akzeptorfluophors detektiert werden. Der RFP-Anregungsfilter wird daher aus dem RFP Filterwürfel entfernt und vor dem LED-Modul der Lichtquelle montiert. Das Anregungslicht wird in der Bandbreite nicht mehr beschränkt und die kurzwelligen GFP-Anregungswellenlängen können den RFP-Filter passieren.

Leica DMI6000 B

Das Setup kann sowohl im Epifluoreszenz- als auch im TIRF-Modus genutzt werden. Es besitzt zwei verschiedene Fluoreszenzlichtquellen, eine Laserbox mit 4 Lasern der gängigen Laserlinien und eine Halogenlampe. Zur Auswahl des Anregungslichtes im Epifluoreszenzmodus wird ein rotierendes Trommelsystem eingesetzt, das schneller arbeitet als das Zeiss-Filterwürfelsystem. Der Probentisch ist motorisiert und kann in z-Richtung durch ein Piezoelement bewegt werden. Die hohe Wechselgeschwindigkeit der Exzitationsfluoreszenz sowie die softwareseitige Kombinationsmöglichkeit von z-Stapel- und monofokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden zum kombinierten 2D – 3D Time-lapse Imaging lebender Zellen eingesetzt.

Bioimager

Der Bioimager ist ein Mikroskopsystem mit einem in x-, y-, z-Richtung frei positionierbaren Objektiv, Inkubation, Temperatur- und Atmosphärenregelung sowie Pipettierroboter zum automatisierten Flüssigkeitshandling. Dieser Hochdurchsatzaufbau ermöglicht ein fluoreszenzbasiertes Screening auf Einzelzellebene in 96-Well Platten.

Lightsheet

Im physikalischen Aufbau unterscheidet sich die Lichtblattmikroskopie von der Epifluoreszenzmikroskopie durch die Fokussierung des Anregungslichtes zu einem Lichtblatt, dass in einem Winkel von 90° zur Detektionsoptik die Probe anregt. Die Probe wird in eine hochviskose, dreidimensionale Matrix eingebettet. Ausschließlich die beobachtete Fokalebene wird in der temperatur- und CO₂-regulierten, wassergefüllten Probenkammer durch das Lichtblatt angeregt. Die Matrix wird automatisiert in vorprogrammierbaren Ebenen und Zeitabständen durch das Lichtblatt gefahren, sodass die einzelnen Schichtaufnahmen die dreidimensionale Rekonstruktion ermöglichen.

FACS

Das Fluorescence Activated Cell Sorting ist ein optisches Messverfahren bei dem Zellmerkmale durch Antikörperkopplung markiert und im Durchflusszytometer quantifiziert werden. Vor der Messung werden fluoreszenzmarkierte Antikörper an die zu bestimmenden Zellen gebunden. Vereinzelte Zellen werden an einem Photodetektor vorbeigeführt, während sie mit den für die markierenden Antikörper spezifischen Wel-

lenlängen beleuchtet werden. Für jede Zelle wird ein Fluoreszenzwert für jeden Fluoreszenzkanal sowie zwei Werte für die Lichtstreuung bestimmt. Dadurch kann für jede Zelle eine Aussage über die Intensität der Fluoreszenzen sowie die Granularität und Volumen getroffen werden. Die Gesamtheit der gemessenen Zellpopulation wird in einem x-, y-Koordinatensystem oder Histogramm dargestellt.

Plate Reader Tecan Genios Pro

Der Tecan Genios Pro Platereader ist ein beheizbarer, filterbasierter Fluoreszenzreader für 96-Well Platten ohne CO₂ Regulation. Er misst in festgelegten Intervallen die Gesamtfluoreszenz der Wells.

Dekonvolution

Die Dekonvolution ist eine iterative, mathematische Methode zur Nachbearbeitung von Bildstapeln mit dem Ziel der Verbesserung des Signal zu Rauschverhältnisses (SNR) und der Auflösung. Bei nicht-konfokalen Mikroskopen strahlt Streulicht aus Bildebenen oberhalb und unterhalb der Fokalebene in diese ein. Das Streulicht einer punktförmigen Lichtquelle strahlt in Form einer Sanduhr in z-Richtung aus. Dieses Modell wird zur schrittweisen Rückrechnung eingesetzt. Der Prozess vergleicht nach jedem Schritt Qualitätsfaktoren mit dem vorherigen Bildstapel und beendet die Berechnungen, wenn die Qualitätsverbesserungen zu gering werden oder eine maximale Anzahl von Berechnungsschritten erreicht ist.

Software

Zur Auswertung der Mikroskopdaten werden die Programme AxioVision (Zeiss), Zen (Zeiss), Leica Application Suite (Leica), ImageJ (Wayne Rasband, Open Source) sowie Imaris (Bitplane) genutzt. Die Neusortierung und Visualisierung tabellarischer Datensätze der Imaris erfolgt mit Igor (WaveMetrics) und einem von Carsten Kummerow programmierten Makro. Die Korrekturfaktoren werden mit dem „FRET and Colocalization Analyzer“ Plugin für ImageJ durchgeführt (Muriel Hachet-Haas, Noel Converset, Olivier Marchal, Hans Matthes, Sophie Gioria, Jean-Luc Galzi 2006).

4.3 Bereits etablierte Methoden

NK Isolation aus Vollblut

Während der Thrombozytenspende wird Blut des Donors zentrifugiert und Thrombozyten werden angereichert. Restliche Blutbestandteile werden dem Spender reinfundiert. Aus dem in Einwegfiltern zurückbleibenden Blut werden durch Ficoll-Gradienten-Zentrifugation mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Die Isolation der NK-Zellen aus den PBMC erfolgt mit Dynabead® Isolationskits. Die Kits enthalten Antikörper gegen Oberflächenmoleküle unerwünschter Zelltypen. Nach Kopplung der Antikörper werden diese durch Magnetaufreinigung vom Überstand getrennt. Die NK-Zellen verbleiben im Überstand. Die Isolation wird nach Herstellerangaben durchgeführt (Lifetechnologies 2012). NK-Zellen werden in einer Dichte von 2×10^6 /ml in AIMV Medium mit 10 % FCS bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Nach Isolation ist die Viabilität von primären NK-Zellen in Kultur für drei Tage stabil. Durch Zugabe von Interleukin-2 (IL-2) mit 100 U/ml können sie stimuliert werden, was ihre Viabilität über einen verlängerten Zeitraum erhält und die Zytotoxizität anregt (Brehm et al. 2011).

Real Time Quantitative PCR

Die mRNA-Isolation, cDNA-Umschreibung und qRT-PCR wurden von der technischen Assistentin Gertrud Schwär nach Protokollen gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die qRT-PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR® Green PCR Kit durchgeführt (Qiagen 2011). Die Primerpaare wurden von Barbara Niemeyer abgeleitet und von MWG-Biotech synthetisiert.

QuikChange® PCR

Als Nachweis des Funktionsprinzips des Casper3-GR Konstruktes wurde die Aminosäuresequenz der Caspase-3 Bindestelle durch eine QuikChange® PCR verändert. Die Aminosäuresequenz DEVD des FRET-Sensors wurde zu DEVA mutiert um die Spaltung durch Caspase-3 während der Apoptose zu verhindern. Caspase-3 erkennt die Tetraamminosäuresequenz D-x-x-D, wobei Position 2 und 3 variabel sind, das Aspartat der n-terminalen Position 4 hingegen nicht (Fang et al. 2006). Primer, die durch Punktmutation an der Position des Basenpaares 1400 des Evrogen pCasper3-GR Vektors die Basenabfolge GAC zu GCC verändern, wurden von Barbara Niemeyer abgeleitet, von

MWG-Biotech synthetisiert und eingesetzt, um die Aminosäure Aspartat der Position 4 zu Alanin zu mutieren.

Real-time Killingassay

Der Killingassay misst die Fluoreszenzveränderung einer Zellpopulation über Zeit in einem Well einer 96 Well Platte. Die Zielzellen werden mit Calcein geladen und mit gleicher Zellzahl in mehrere Wells pipettiert. Mittels einer Negativ- (Zielzellen ohne lytischen Einfluss) sowie Positivkontrolle (Zielzellen zusammen mit lysierender Detergenz) werden die Fluoreszenzwerte für null bzw. vollständiges Killing bestimmt. Im Intervall von 10 min werden die Fluoreszenzen im Platereader ausgelesen, jeder Ansatz wird doppelt bestimmt und gemittelt. Der Fluoreszenzverlust eines Wells über Zeit gibt die Vitalität der Zellpopulation an. Der Killingassay wurde nach Literaturangaben durchgeführt (Kummerow et al. 2014).

FACS

Alle Antikörperinkubationen wurden von Arne Knörk nach Herstellerangaben durchgeführt. Isotypenkontrollen wurden auf das jeweilige Fluoreszenzlabel und den Antikörperisotyp abgestimmt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Zelllinien wurden je 1×10^6 Zellen in PBS mit 0,5 % BSA gewaschen und in 300 μ l PBS BSA aufgenommen. Pro Ansatz wurden 1×10^5 Zellen gemessen.

4.4 Entwickelte und adaptierte Methoden

Herstellung stabiler Zelllinien

Je 3×10^6 Zellen der Linien Jurkat E6-1 sowie K562 wurden im Programm X-005 mit dem Lonza Nucleofector transient mit 2 μg pCasper3-GR Vektor(Evrogen 2008) transfiziert. Die Zellen wurden zunächst 6 Tage mit 2,5 mg/ml G418, anschließend 12 Tage mit 1,25 mg/ml G418 selektioniert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 0,5 Zellen/Well in 96-Well Platten pipettiert. Wells, die nur eine Zelle enthielten, wurden markiert und 3 Tage später bei Farbumschlag des Mediums auf Fluoreszenz kontrolliert. Monoklonale, fluoreszente Kolonien wurden sukzessive in größere Kulturflaschen umgesetzt. Die Funktion des fluoreszenzintensivsten Klon wurde durch Applikation des Apoptoseinduktors Staurosporin überprüft. Von 8 stabilen Zelllinien wurden je 2 Cryovials eingefroren, von dem getesteten Klon wurden 15 Cryovials eingelagert.

Imaging der stabilen Zelllinien in einer 96-Well Platte, Apoptoseinduktion durch Staurosporin und CD95 Antikörper

Die Wells der 96-Well Platte werden mit je 50 μl 1 x Poly-L-Ornithin gefüllt und 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird das Poly-L-Ornithin abgesaugt und je 1×10^5 Zellen der stabilen Linien Jurkat E6-1 pCasper sowie K562 pCasper in RPMI FCS P/S im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 für 30 min adhärirt. Die Ansätze werden abgesaugt und mit je 200 μl RPMI P/S gefüllt. Je nach Ansatz werden 2,5 μM Staurosporin bzw. 5 mg/ml Apo 1-1 Antikörper zugegeben. Das Imaging erfolgt mit dem Zeiss Cell Observer bei 37 °C, 5 % CO_2 , 20 x Objektiv als Multi-Position Experiment mit einem Intervall von 5 min und einer Gesamtdauer von 6 h. Die Anregung erfolgt bei 25 % LED-Stärke mit Belichtungszeiten von RFP 300 ms, FRET 600 ms, GFP 300 ms. Das Durchlicht wird bei 2,5 V Halogenlampenspannung und geöffneter Apertur für 10 ms belichtet.

Transiente Transfektionen zur Bestimmung der Korrekturfaktoren

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren des Casper3-GR FRET-Systems wurden je 3×10^6 Jurkat E6-1 mit je 2 μg TagGFP-DNA sowie TagRFP-DNA mit dem Lonza Nucleofector® II im Programm C-016 mit Kit V nach Protokoll transfiziert (Amaxa 2015), anschließend in 10 ml RPMI+FCS+Pen/Strep aufgenommen und in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml bei

37 °C, 5% CO₂, 5 % O₂ im Brutschrank inkubiert. 25 mm Coverslips wurden mit 50 µl 0,1 mg/ml p-Ornithin 30 min bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde das p-Ornithin abgesaugt. Je $0,75 \times 10^6$ Zellen wurden 5 min bei 300 g zentrifugiert, das Pellet wurde in 50 µl RPMI+FCS+Pen/Strep resuspendiert und auf die beschichteten Coverslips aufgebracht. Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer im Brutschrank 30 min zur Adhärenz an der beschichteten Glasoberfläche inkubiert. Anschließend wurde der Coverslip mit RPMI+Pen/Strep gespült, in den Aluminiumadapter der Mikroskopstage eingesetzt und mit 1 ml RPMI + Pen/Strep überschichtet.

Das Mikroskop wurde auf 37 °C vorgeheizt und die Inkubation mit 5 % CO₂ durchgeführt. Die Bildakquise erfolgte für alle Kanäle mit einem 20 x Objektiv bei 300 ms Belichtungszeit bei 25 % LED Energie.

Hintergrundkorrektur, FRET-Berechnung nach Youvan und FRET Donor Ratio

Die Bestimmung der Korrekturfaktoren erfolgte mit je 300 ms Belichtungszeit bei 25 % LED-Intensität in allen Fluoreszenzkanälen. Hintergrundsubtraktion erfolgte in dem Programm ImageJ mit dem rolling ball Algorithmus (Radius 20 µm). Die FRET Berechnung wurde mit dem Physiologiemodul des Programms Axiovision (Zeiss) durchgeführt. Das FRET-Donor Ratio wurde durch Division der FRET-Werte nach Youvan (Youvan, Silva, and Bylina 1997) durch die Werte des Donorkanals berechnet.

Calcein- und Propidiumiodidfärbung zur Nekrosedetektion, Berechnung der Kinetik, zeitliche Normierung

25 mm Glascoverslips wurden mit je 50 µl 0,1 mg/ml poly-Ornithin 30 min bei Raumtemperatur (RT) gecoatet. Pro Ansatz wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen 8 min bei 300 g abzentrifugiert und 15 min in 1 ml AIMV + 10 mM Hepes (AIMV*) mit 500 nM Calcein bei RT auf einem Schüttler gefärbt. Nach dem Färben wurden die Zellen zentrifugiert, in je 100 µl AIMV* aufgenommen und auf dem Coverslip 30 min im Brutschrank abgesessen. Nicht adhärente Zellen wurden abgespült und der Ansatz anschließend mit 1 ml 0,5 mM Kalziumpuffer mit 100 µM Propidiumiodid (PI) in einem Aluminiumadapter mit Teflonspannring überschichtet. Die Inkubation im Mikroskop erfolgte bei 37°C ohne

CO₂. 2×10^5 NK wurden 8 min bei 300 g abzentrifugiert und in 50 µl 0,5 mM CaCl₂ aufgenommen und nach Start der Bildakquise dem Ansatz zugegeben. Die Bildakquise erfolgte im 4 s Intervall im Durchlicht, Calcein (200 ms bei 1% LED) und PI Fluoreszenzkanal (300 ms bei 25 % LED) mit einem 20 x Objektiv. Zellen wurden mit dem Physiologiemodul des Programms Axiovision (Zeiss) als ROI definiert und der mittlere Grauwert jedes ROI in den Fluoreszenzkanälen für jeden Zeitpunkt ausgelesen. Die Werte wurden in Excel hintergrundkorrigiert. Die Intensitäten wurden normiert, indem jeder Messwert durch den ersten Messwert geteilt wurde (F/F_0). Die zeitliche Normierung erfolgte über den Zeitpunkt, zu dem die Calceinfluoreszenz 50 % erreichte. Die prozentuale Fluoreszenzveränderung im Calceinkanal zum vorhergehenden Messwert wurde berechnet. Die Fluktuation des Calcein vor der Nekrose betrug < 1 %. Der Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenzintensität erstmalig um > 1 % sank, wurde als Beginn der Nekrose, $t = 0$ s definiert. Analog wurde der Zeitpunkt, zu dem die Intensität weniger als 1 % sank als Ende der Nekrose definiert. Der Durchschnittswert der Fluoreszenzen pro Zeitpunkt jedes Kanals samt Standardabweichung wurde berechnet.

Calcein Fura-2 Doppelfärbung

Analog zum vorherigen Protokoll wird zusätzlich zu Calcein 1 µM Fura-2 im gleichen Ansatz geladen.

Imaging der Jurkat E6-1 pCasper mit primären NK-Zellen zur Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften bei verschiedenen Zielzelltoden

25 mm Coverslips wurden mit 50 µl 0,1 mg/ml Fibronectin 30 min bei RT beschichtet, anschließend abgesaugt und $1,5 \times 10^5$ Jurkat E6-1 pCasper in 50 µl RPMI+FCS+Pen/Strep im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ auf dem gecoateten Bereich abgesessen. Nicht adhärierte Zellen wurden durch zweimaliges Spülen mit je 1 ml RPMI+FCS+Pen/Strep entfernt. Der Coverslip wurde in einen Aluminiumadapter eingesetzt, mit einem Teflonspannring gesichert, mit 1 ml RPMI+FCS+Pen/Strep + 10 mM Hepes überschichtet, in das Mikroskop eingesetzt und bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Bildakquise erfolgte im 10 s Intervall im GFP, FRET und Durchlichtkanal. Belichtungszeiten wurden bei 25 % LED Stärke so gewählt, dass 30 % der Grauwerte des 12-bit Kame-

rachips gesättigt wurden. Die Aufnahmedauer betrug entweder zwei oder acht Stunden. 2×10^5 NK-Zellen wurden nach Beginn der Bildakquise in 25 μ l RPMI+FCS+Pen/Strep+10 mM Hepes hinzugegeben und sanken während des laufenden Experimentes zu den am Coverslip adhärenierten Zielzellen ab.

Zur quantitativen Analyse wurden die Zielzellen mit dem Physiologiemodul des Programms Axiovision (Zeiss) als ROI markiert. Bei Bewegung der Zelle wurde die ROI manuell auf den Zellmittelpunkt zentriert. Die mittleren Grauwerte der ROI im GFP- und FRET-Kanal für jeden Zeitpunkt wurden bestimmt und hintergrundbereinigt. Zur zeitlichen Normierung wurde bei den apoptotischen Zellen der Zeitpunkt bestimmt, bei dem sich das GFP-Signal um mehr als 1 % zum vorherigen Zeitpunkt erhöht, bei nekrotischen Zellen der Zeitpunkt, bei dem sich das FRET-Signal um mehr als 1 % zum vorherigen Zeitpunkt verringert. Dieser Zeitpunkt wurde als $t = 0$ min (F_0) definiert und die Fluoreszenzwerte der Kanäle F/F_0 normiert. Mittelwert sowie Standardabweichung der GFP- und FRET-Fluoreszenz aller Zellen einer Zelltodkategorie wurde bestimmt. Zur besseren Übersicht wurde jede zehnte Standardabweichung in die Diagramme eingezeichnet. Zur Bestimmung des Donor Ratio wurden die Fluoreszenzwerte entsprechend ihrer Belichtungszeiten normiert.

Life-cell-imaging Langzeitmessungen der NK-Zellen

Wells einer schwarzen 96-Well-Platte mit optischem Boden wurden mit 50 μ l 0,1 mg/ml Fibronectin 30 min bei RT beschichtet, anschließend abgesaugt und mit je 7×10^5 Jurkat E6-1 pCasper in 100 μ l AIMV+FCS+P/S+Hepes befüllt. Umliegende Wells wurden als Evaporationsschutz mit H_2O dd. befüllt. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C im Brutschrank abgelesen, anschließend mit AIMV+FCS+Hepes gespült und 200 μ l überschichtet. Nach Beginn der Messung wurden pro Well 5×10^4 NK-Zellen zugegeben, diese wurden zuvor 30 min in AIMV+FCS+P/S+Hepes mit 500 nM Hoechst 33342 geladen, anschließend 8 min bei 200 g abzentrifugiert und in 100 μ l Hoechst-freiem Medium aufgenommen. Die Bildakquise erfolgte bei 25 % LED mit einem 10 x Objektiv über 8 h. Zur Auswertung wurden die Kanäle mit dem rolling ball-Algorithmus mit einem Radius von 200 Pixeln hintergrundbereinigt und anschließend als GFP-FRET-Durchlicht overlay mit FIJI dargestellt. Pro Messung wurden 10 bis 12 NK-Zellen zufällig ausge-

wählt und beobachtet. Folgende Zeitpunkte wurden tabellarisch erfasst: Kontakt zur Zielzelle, Platzen der Zielzelle, Ratio Umschlag der Zielzelle, Zeitpunkt der Inaktivität oder Tod der NK-Zelle. Folgewerte wurden mit dem Programm Excel (Microsoft) errechnet. Für jeden NK-Spender wurde eine Kontrolle ungefärbter NK gemessen. Die Kontrollpopulation wurde getrennt ausgewertet und mit der Hoechst-gefärbten Population verglichen, um Artefakte durch die DNA-Inkarnation des Farbstoffs zu vermeiden. Der Vergleich ergab, dass der Hoechst-Farbstoff unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Zytotoxizität und Viabilität der NK-Zellen hat. Alle Ansätze wurden daher gepoolt und gemeinsam ausgewertet.

Monofokale NK92-Lysotrackeraufnahmen zum seriellen / parallelen Killing

$0,75 \times 10^5$ NK92 wurden mit 100 nM LysoTracker® Red geladen und mit $0,75 \times 10^5$ Jurkat E6-1 pCasper in AIM V–FCS+Hepes+100 nM LysoTracker® Red Medium auf einem mit 0,1 mg/ml Fibronectin beschichteten Coverslip 90 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und gleichzeitig im GFP-, FRET-, LysoTracker Red- und Durchlichtkanal im 10 s Intervall in einer Fokalebene mikroskopiert. Die einzelnen tif-Bilder des GFP, FRET sowie LysoTracker-Kanals wurden mit dem rolling ball-Algorithmus (Radius 200 Pixel) in ImageJ hintergrundkorrigiert. Ein Overlay aller Kanäle wurde erzeugt und der LysoTracker-Kanal mit einer fire-LUT dargestellt. Kumulativ translozierte Vesikel wurden mit dem Programm Imaris (Bitplane) im LysoTracker-Kanal automatisch erfasst und in ihrem Pfad verfolgt (getracked). Der Track wurde in das Overlay der Kanäle eingezeichnet. Dauer und Zeitpunkte der Zellkontakte, der Vesikel an der Membran, der Caspaseaktivität sowie Membrandisruptionen wurden visuell bestimmt und mit dem Programm Excel (Microsoft) als Zeitgraph dargestellt.

Z-Stack Aufnahme primärer NK zum seriellen / parallelen Killing sowie Einzelvesikeltracking

Die Exozytose eines Vesikels an einer echten IS in vitalen Zellen mikroskopisch zu erfassen stellt hohe Anforderungen an die räumliche sowie zeitliche Qualität der Daten. Dies mit dem FRET-Feedback des Casper-Sensors zu koppeln (um die Abtötung der

Zielzelle zu messen) erhöht die Anforderungen weiter. Folgende experimentelle Limitierungen müssen durch die Optimierung der Bedingungen bestmöglich gelöst werden:

- a) Die Transfektionseffizienz primärer NK-Zellen sowie NK92 ist gering. Lonza gibt unter Verwendung des NK-Zell spezifischen Transfektionskits sowie des zytosolischen, eGFP-kodierenden Standardvektors eine Effizienz von 16,9 % bei einer Viabilität von 50 % bis 60 % an (Lonza 2009). Vorversuche mit dem Standardvektor sowie einem Granzym B-mCherry Konstrukt, welches in CD8⁺ Zellen erfolgreich zur Expression gebracht wurde, verliefen negativ. Zum Labeling der Vesikel wurde daher der Farbstoff LysoTracker® Red genutzt. Dieser färbt saure Kompartimente der Zelle und somit alle Lysosomen. Die Bleichstabilität ist geringer im Vergleich zu Fluophoren und durch seine Anwesenheit im Überstand färbt er ebenfalls die Lysosomen der Zielzellen.
- b) Die Größe zytotoxischer Vesikel ist kleiner als das Diffraktionslimit des Mikroskopes (Vesikelgröße ca. 200 nm (Schwarz and Bhat 2016; Théry, Ostrowski, and Segura 2009)). Die Auflösung eines Mikroskops, also der Abstand zweier Punkte, die noch getrennt voneinander wahrgenommen werden können, ergibt sich aus der Formel $d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$ von Ernst Karl Abbe. Die Wellenlänge der LysoTracker-Anregung beträgt 577 nm, die Numerische Aperatur des genutzten Objektives (n des Mediums mal halber, objektseitiger Öffnungswinkel) 1,47 (Werksangabe) für Glas mit dem Brechungsindex 1,51 und somit einer NA von 1,29 (errechnet) für Wasser mit dem Brechungsindex 1,33. Es ergibt sich somit ein Diffraktionslimit von $d = \frac{577 \text{ nm}}{2 \cdot 1,29} = 223,64 \text{ nm}$. Punkte, deren Halbmaxima sich näher an einander als 223,64 nm befinden, können nicht mehr getrennt aufgelöst werden. Dies ist die theoretische Auflösungsgrenze bei perfekten optischen Bedingungen (optimaler Linsenbeschaffenheit und Ausrichtung der Komponenten).
- c) Zytotoxische Vesikel werden in Zellen durch Motorproteine entlang den Microtubuli transportiert, die durch das MTOC koordiniert werden (Orange 2009). Ihre Eigenbewegung erzeugt bei der Aufnahme von z-Stapeln folgende Probleme:
 - I. Bewegung parallel zur Aufnahmeichtung: Vesikel wird mehrfach detektiert und in z-Richtung dadurch elongiert aufgenommen.

- II. Bewegung entgegengesetzt zur Aufnahmerichtung: Vesikel wird nicht oder in z-Richtung gestaucht aufgenommen.
- III. Ist das Aufnahmeintervall der z-Stapel zu groß, kann die Position einzelner Vesikel von einem Stapel zum nächsten nicht kontinuierlich nachvollzogen werden und es besteht die Möglichkeit der Verwechslung.
- IV. Durch das Clustern der Vesikel und deren Größe in Kombination mit der Diffraktionslimitierung der Weitfeldmikroskopie (die aufgrund der probenschonenden Exzitation und des Geschwindigkeitsvorteiles gegenüber Superresolutionssystemen erforderlich ist), ist es nicht trivial einzelne Vesikel innerhalb der MTOC-organisierten Vesikelgruppe zu identifizieren.

Um diesen Limitierungen zu begegnen, wurden folgende Lösungsansätze verfolgt:

- a) Der rote, stabilere LysoTracker wurde in einer höheren Konzentration (400 nM) geladen und in den Überstand gegeben um das Nachladen der Vesikel während der Aufnahme zu erhöhen und dem Bleichen entgegenzuwirken. Die Vesikel der Zielzellen wurden in der späteren Nachbearbeitung der Daten von der Analyse ausgeschlossen.
- b) Die aufgenommenen Daten wurden dekonvoluiert, also softwareseitig aufbereitet. Die Punktspreizfunktion (PSF) wurde in einem iterativen Prozess rückgerechnet, wodurch die Intensität punktförmiger Lichtquellen erhöht und der Hintergrund erniedrigt wurde. Durch die Verfeinerung aufgenommener Strukturen erhöhte sich gleichzeitig die Auflösung, da das Diffraktionslimit gesenkt wurde. Zur Dekonvolution wurde eine experimentelle PSF fluoreszenter 100 nm Beads genutzt. Der Brechungsindex vom Glas des coverslip ändert sich beim Übergang in das wässrige Medium. Mit zunehmender z-Höhe ist die PSF-Ausdehnung beidseitig durch das wässrige Medium bestimmt. Die zur Dekonvolution genutzte PSF wurde softwareseitig darauf angepasst. Dass die Ebenen eines z-Stacks nicht gleichzeitig, sondern kontinuierlich entlang der Scanrichtung aufgenommen werden und sich die Vesikel während dieser Scanzeit bewegen, konnte unter aktuellen Voraussetzungen weder soft- noch hardwareseitig kompensiert werden.

- c) Vorversuche zeigten, dass die intrazelluläre Vesikelgeschwindigkeit durch Veränderung der Temperatur beeinflusst wird. Der Inkubator des Mikroskopes wurde mit 5 % CO₂ versorgt, jedoch nicht beheizt. Durch Abkühlen des Raumes konnten stabile Temperaturbedingungen im Mikroskop beginnend ab 18 °C erreicht werden. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Zellen bei 18 °C weder am Coverslip anhaften noch migrieren. Ab 20 °C war (nach subjektiver Einschätzung) normales Zellverhalten zu beobachten. Um Problemen theoretisch möglicher Temperaturschwankungen vorzubeugen wurden die Experimente bei 22 °C durchgeführt. Zur Minimalisierung der Aufnahmedauer eines Z-Stapels bei gleichzeitiger Probenschonung wurde die Exzitationszeit pro z-Ebene auf 75 ms minimalisiert und die z-Schrittweite gemäß Nyquist auf 440 nm eingestellt (SVI 2015). Der z-Stapel wurde hardwaregetriggert aufgenommen und in festgelegten Intervallen für die monofokale Aufnahme des Casper3-GR sowie Durchlicht unterbrochen.

Probenvorbereitung:

$0,75 \times 10^5$ primäre NK wurden mit 400 nM LysoTracker® Red in 1 ml AIM V + FCS + Hepes 30 min im Brutschrank geladen, anschließend direkt auf den mit $0,75 \times 10^5$ Jurkat E6-1 pCasper auf Fibronectin beschichteten Coverslip in gleichem Medium gegeben und im Mikroskop bei 20 °C, 5 % CO₂ absitzen gelassen.

Das gesamte Mikroskop wurde auf 22 °C abgekühlt. Der Lysotracker-Kanal wurde mit 30 bis 35 z-Ebenen im Abstand von 440 nm aufgenommen. Beginn und Ende des z-Stapels wurde ober- und unterhalb der NK-Zelle gesetzt. Auf den Autofocus wurde aus Geschwindigkeitsgründen verzichtet. Die Belichtungszeit pro z-Ebene wurde mit 75 ms auf das Minimum reduziert. Die Intensität der Lampe wurde zur Vermeidung der Phototoxizität auf 1/5 eingestellt, der Kamera Gain wurde auf 220. Der Aufnahmebereich des Kamerachips wurde reduziert um höchstmögliche Auslesegeschwindigkeit zu erreichen. Die z-Aufnahme wurde in sich wiederholenden Schleifen durchgeführt, alle 60 s wurde der GFP- und FRET-Kanal monofokal aufgenommen. Alle Fluoreszenzkanäle wurden hardwaregetriggert angesteuert. Alle 5 min wurde der Durchlichtkanal aufgenommen.

Der LysoTracker-Kanal wurde je nach Auswertung mit ImageJ zu einer Maximum Intensity Projection zusammengefasst oder mittels Huygens-Software dekonvoluiert und mittels Imaris getracked. Der Ausschluss von Vesikeln in Zielzellen (die von LysoTracker ebenfalls angefärbt wurden) erfolgte nach Driftstabilisierung mittels Imaris und anschließender Definition einer 3D ROI, die ausschließlich die NK-Zelle beinhaltet. Die Auswahl der Vesikeltracks erfolgte nach Definition einer Mindesttracklänge von 120 s sowie einer Mindestfluoreszenzintensität von 1/5 der Fluoreszenz des hellsten Vesikels. Bei der Auswahl der Tracks wurde durch manuelle Kontrolle darauf geachtet, dass die Vesikel nicht innerhalb einer Gruppe verschmelzen und über den Beobachtungszeitraum hinweg kontinuierlich als einzelnes Vesikel erkannt werden können.

Apoptose- / Nekrosedetektion auf Populationsebene durch aufgereinigtes Perforin / Granzym B

Der Assay wird in nominell kalziumfreien Puffer in einer 384-Well Platte durchgeführt und während der Aufnahme im Mikroskop bei 37 °C, 5 % CO₂-Bedingungen inkubiert. Die Zielzellen sind am gecoateten Plattenboden adhärirt und mehrere Wells der Platte werden über zwei Stunden sequenziell nacheinander mikroskopiert. Als Viabilitätskontrolle werden die Zellen zu Beginn 30 min mikroskopiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von aufgereinigtem Perforin sowie Granzym B in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Wells werden weitere 30 min im kalziumfreien Puffer mikroskopiert. Perforin besitzt eine C2-Bindedomäne und kann ohne freies Kalzium seine lytische Aktivität nicht entfalten. Nach Kalziumzugabe (Endkonzentration von 1,25 mM) wird Perforin lytisch aktiv. Die Aufnahmen werden mit einem 5 x Objektiv durchgeführt. Da die Zielzellen migrieren, werden sie anschließend mit Imaris getracked (8 µm Objektgröße, maximale Detektionslücke 3 Frames, maximale Schrittdistanz zwischen Frames 4 µm) und die Casper3-GR-Fluoreszenzwerte über Zeit ausgelesen. Der schlagartige Verlust der RFP-Fluoreszenz dient als Nekrose-, der graduelle Abfall des FRET-Donor Ratio als Apoptoseindikator.

Sowohl Perforin als auch Granzym B wurden von Enzo Life Sciences aus YT NK-Zellen aufgereinigt. Die Effektivität des Perforins wird in PU (permeabilizing units) definiert. In

dieser Maßeinheit sind 0,1 PU in 100 μ l in der Lage, 50 % von 1×10^6 Jurkat Zielzellen zu permeabilisieren, gemessen durch PI-Staining. 0,1 PU entsprechen nach Herstellerangaben 2 ng Perforin in 100 μ l Puffer, also 20 pg/ μ l (Enzo Life Sciences 2015b; Shi et al. 2005). Um die dosisabhängige Wirkweise des Perforin zu untersuchen, wurden Ansätze bis 200 pg/ μ l getestet. Granzym B induziert nach Herstellerangaben mit 1 ng/ μ l Apoptosen in 1×10^6 Zielzellen, wenn es mittels eines angemessenen Reaktionspartners in die Zielzellen verbracht wird (Enzo Life Sciences 2015a; Shi et al. 2005). In Vorversuchen wurde zur Verbrauchsoptimierung eine apoptotisch wirksame Konzentration von 200 pg/ μ l bestimmt.

Apoptose / Nekrose der Jurkat E6-1 pCasper durch NK-Zellen in unterschiedlichen Kalziumpuffern

$0,75 \times 10^6$ Jurkat E 6-1 pCasper Zellen werden auf mit 0,1 mg/ml Fibronectin beschichteten Coverslips 30 min im Brutschrank inkubiert und entweder mit 0 oder 1 mM freiem Kalzium mit $0,2 \times 10^6$ NK-Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ über 2 h inkubiert und im 10 s Intervall im Durchlicht, GFP- sowie FRET-Kanal mikroskopiert. Die Auswertung erfolgt durch manuelles Tracking der Zielzellen mit dem Programm AxioVision (Zeiss) und anschließender Berechnung der Donor-Ratios und RFP-Signale in Excel. Zur Verringerung der Phototoxizität wurde die RFP- Bleichkontrolle nicht experimentell bestimmt, sondern aus dem GFP- sowie FRET-Signal berechnet. Hierzu wurden das GFP- sowie FRET-Signal F/F₀ normiert und mit der Formel $(0,42 \cdot \text{GFP}) + (0,58 \cdot \text{FRET})$ miteinander verrechnet. Die Faktoren 0,42 sowie 0,58 wurden durch Abgleich mit mehreren Experimenten verifiziert.

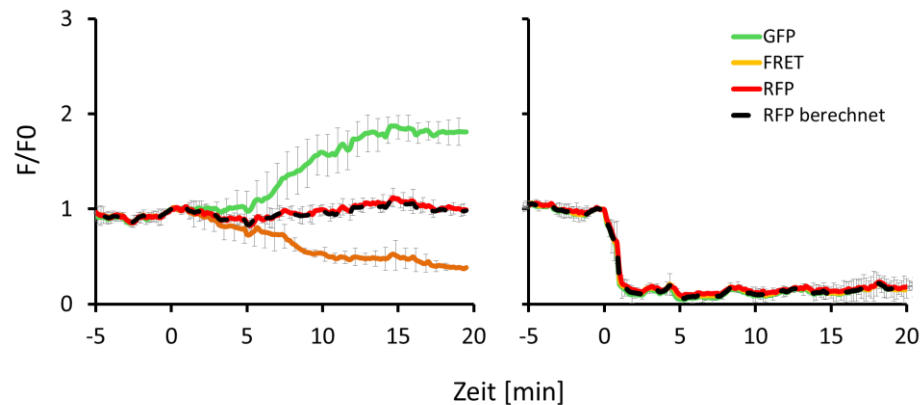


Abbildung 1: Das RFP-Signal kann durch $0.42 \cdot \text{GFP} + 0.58 \cdot \text{FRET}$ berechnet werden

Jurkat E6-1 pCasper wurden auf Fibronectin beschichtet und über 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und im GFP, RFP und FRET-Kanal im Intervall von 10 s mikroskopiert. Von jeweils drei apoptotischen sowie nekrotischen Jurkat E6-1 pCasper wurden die Fluoreszenzen über Zeit ausgelesen. Die Zellen wurden auf den Zeitpunkt der Apoptose (GFP-Anstieg) sowie Nekrose (RFP-Verlust) zeitlich und in ihrer Intensität F/F₀ normiert. Für jede Zelle wurde ein artifizielles RFP-Signal errechnet, indem das GFP-Signal mit 0.42, das FRET-Signal mit 0.58 multipliziert wurde. Die Mittelwerte jedes Fluoreszenzkanals sowie des errechneten RFP-Signales wurden bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Sowohl während der Apoptose als auch der Nekrose überlagert das errechnete RFP-Signal das experimentell bestimmte sehr gut. Mögliche Unterschiede in den Exzitationszeiten sowie Intensitäten der LED-Lichtquellen zwischen verschiedenen Experimenten werden durch die F/F₀-Normierung ausgeglichen.

Durch Verrechnung des GFP- und FRET-Signales kann das RFP-Signal berechnet werden. Während der Apoptose bleiben sowohl das experimentell bestimmte als auch das errechnete Signal stabil. Während der Nekrose fallen beide schlagartig ab. Daher kann zur Probenschonung auf die experimentelle Bestimmung des RFP-Signales verzichtet werden. Alle Messwerte wurden hintergrundkorrigiert und F/F₀ normiert. Bei vitalen Zellen wurde F₀ gleich nach dem Experimentbeginn, bei abgetöteten Zellen gleich dem Beginn der Apoptose bzw. Nekrose definiert, welche jeweils über den GFP-Anstieg bzw. RFP-Verlust bestimmt wurden. Die errechneten Donor Ratio- sowie RFP-Werte wurden mit Igor in einem 2D-Plot gegeneinander aufgetragen.

Inhibition von Nekrosen durch Concanamycin A (CMA)

CMA wird als 200 µM Stock in DMSO gelöst. Zur Vorinkubation wird es in Medium verdünnt und bei 37 °C, 5 % CO₂, mit den Killerzellen im Brutschrank inkubiert. Um mögliche Effekte auf die Zielzellen auszuschließen, werden die Killerzellen nach der Inkubation gewaschen und in einem CMA-freien Ansatz gemeinsam mit Zielzellen inkubiert.

Um die optimale Inkubationsdauer sowie minimal mögliche Konzentration CMA zu bestimmen, wurden Titrationsmessungen durchgeführt. CMA wurde 2 bzw. 4 h in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M mit NK-Zellen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden NK-Zellen 1:20 mit DMSO vorinkubiert, um die Kontrolle adäquat an die DMSO-Konzentration der der höchsten CMA-Konzentration anzupassen.

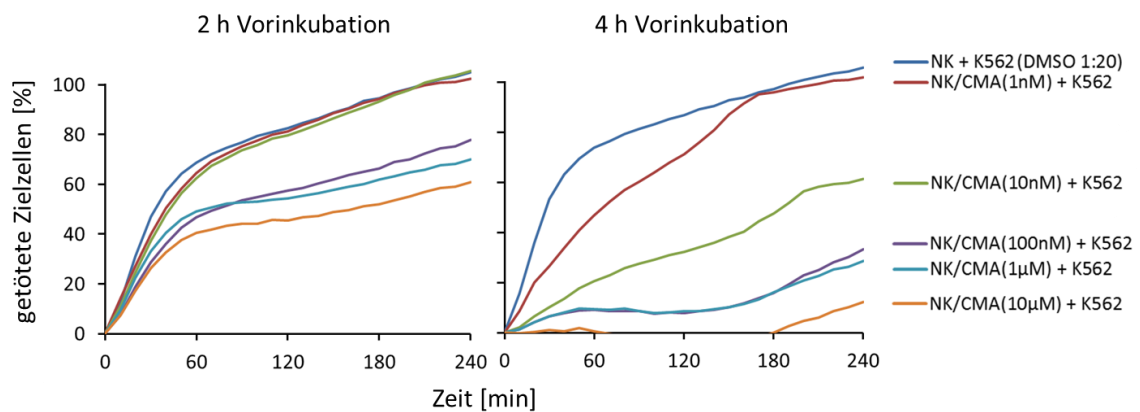


Abbildung 2: 100 nM CMA bei 4 stündiger Vorinkubation verhindern die Induktion von Nekrosen durch NK-Zellen

Getestet werden NK-Zellen gegen K562, ein System in dem die Zielzellen ausschließlich durch Nekrosen abgetötet werden. In den DMSO-vorinkubierten Kontrollversuchen werden nach 4 Stunden 100 % der Zielzellen getötet. Bei zweistündiger Vorinkubation der Killerzellen mit CMA wird die Zytotoxizität auf ca. 50 % reduziert. Nach vierstündiger Vorinkubation werden in der Kontrolle ebenfalls 100 % der Zielzellen abgetötet. Der dosisabhängige Einfluss des CMA ist stärker ausgeprägt, bereits 100 nM reduzieren das Killing über 3 Stunden unter 10 %. 1 μ M CMA zeigt keine Verbesserung dieses Effektes, 10 μ M führen zu Messartefakten, die Anzahl getöteter Zielzellen fällt unter 0 %, wahrscheinlich ausgelöst durch den Einfluss des DMSO auf Calcein. Nach 3 Stunden zeigt sich in allen Ansätzen ein linearer Anstieg getöteter Zellen, was auf ein Wiedereinsetzen zytotoxischer Mechanismen während des Experimentes hinweist.

Im Einklang mit Literaturergebnissen (Kataoka et al. 1996) werden die Zielzellen in den Experimenten 4 Stunden mit einer Konzentration von 100 nM CMA in AIMV + FCS mit 10 mM Hepes in einer 24 Well-Platte in einem Volumen von 1 ml pro Ansatz vorinkubiert, anschließend zentrifugiert (200 g, 8 min), in AIMV + Hepes aufgenommen und mit den Zielzellen mikroskopiert bzw. im Platerereader gemessen. Das Killer- zu Zielzellenverhältnis beträgt bei Platerereaderexperimenten 5:1, also $0,125 \times 10^6$ NK-Zellen zu $0,25 \times 10^5$ Zielzellen in 250 μ l Gesamtvolumen in einer 96-Well Platte. Zum life-cell Imaging wurden Killerzellen vorinkubiert und auf coverslips gemeinsam mit auf Fibronectin abgesessenen Zielzellen in AIMV+Hepes mikroskopiert, analog der bereits aufgeführten Protokolle.

Inhibition von Apoptosen durch anti-CD178-Antikörper

Mouse Anti-Human CD178 Antikörper wurde mit 10 µg/ml 1 h mit NK-Zellen im Brutschrank in AIMV + Hepes inkubiert. Bei CMA + anti-CD178 Inkubation wurde der anti-CD178 Antikörper 3 Stunden nach CMA Inkubationsbeginn dem Ansatz hinzugegeben. Nach Inkubation wurden die Ansätze 8 min bei 200 g zentrifugiert, in AIMV + Hepes + 10 µg/ml anti-CD178 aufgenommen und gemeinsam mit NK-Zellen im Gesamtvolumen von 250 µl in einer 96-Well Platte im Platerader gemessen.

Generierung der 3D-Kollagen Matrix mit Ziel- und NK-Zellen

Die 3D-Kollagen-Matrix wird mit Nutragen® von Advanced BioMatrix entsprechend den Herstellerangaben und dem von Rouven Schoppmeyer etablierten Protokoll hergestellt. Zunächst werden 8 Teile des flüssigen, unter 10 °C gelagerten, 99,9 prozentigem Kollagen mit 1 Teil 10 x PBS gemischt und anschließend mit 0,1 M NaOH auf pH 7.2 bis 7.6 eingestellt. Das Gemisch wird auf 10 Teile mit H₂O dd. aufgefüllt. Während der gesamten Prozedur wird das Kollagen auf Eis pipettiert und unter 10 °C gehalten. $0,25 \times 10^6$ NK-Zellen werden mit 500 nM LysoTracker Red im Brutschrank vorinkubiert, anschließend mit $1,5 \times 10^6$ Zielzellen in 50 µl Kollagen gemischt und in eine Zeiss Lightsheet Glaskapillare aufgezogen. Die Kapillare wird vertikal im Brutschrank fixiert und bei 37 °C, 5 % CO₂ eine Stunde ausgehärtet. Anschließend wird sie in das Z.1 eingesetzt, die Probe aus der Glasummantelung heraus in das Medium gesenkt und mikroskopiert. Das Medium wird mit 500 nM LysoTracker Red versetzt und bei 37 °C mit 5 % CO₂ begast.

Stabilisierung der Lightsheet Datensätze inklusive 3D Tracking

Lightsheet-Datensätze werden im Format mehrerer, fortlaufend nummerierter .czi (xyz[t]) Dateien gespeichert. Der 3D-Timelapse Datensatz wird mit dem Programm Zen (Zeiss) geöffnet und in einer .czi Datei gespeichert (4 dimensionale xyz t Werte). Diese Datei kann mit Imaris (Bitplane) eingelesen und zum Imaris-Format .ims konvertiert werden. Die Recodierung wurde gemeinsam mit Rouven Schoppmeyer etabliert. Die Zielzellen werden anschließend anhand der GFP-Fluoreszenz getracked, LysoTracker

Red geladene NK-Zellen somit ausgeschlossen. Als Vorgabe werden sphärische ROI mit 8 μm Durchmesser erstellt. Dies vermindert bei NK-Kontakt den Einfluss durch LysoTracker Red geladene Vesikel der NK-Zellen auf die FRET- sowie RFP-Fluoreszenz der pCasper Zielzellen, die einen Durchmesser von 10 μm haben. Die Trackerfassung erfolgt mit einer maximalen Detektionslücke von 3 Zeitpunkten bei einer maximalen Schrittweite der Objekte von 5 μm zwischen den Zeitpunkten. Nach Generierung der Tracks wird der Datensatz stabilisiert. Imaris bewertet hierzu gleichzeitige, gleichgerichtete Bewegungen aller Zellen, die sich normalerweise autoregressiv in diverse Richtung bewegen und berechnet daraus einen Verschiebungsvektor, der von allen Einzeltracks abgezogen wird. Der Datensatz wird in 3D auf das gemeinsame, stabile Volumen gecropped. Mit dem Video Renderer wird der Datensatz visualisiert. ROIs, die sich an der Grenzfläche des Aufnahmevervolumens befinden, werden manuell entfernt. Die Statistik aller Tracks wird ausgelesen (Fluoreszenzintensitäten, Bewegungsgeschwindigkeiten etc.). Die Fluoreszenzintensitäten werden in Igor (Wavemetrics) eingelesen und nach TrackID sortiert. Das Sortierskript wurde von Carsten Kummerow geschrieben. Die neu sortierten Datensätze werden in Excel (Microsoft) eingelesen und bleichkorrigiert. Hierzu werden vitale Zellen ausgewählt und die Signale mit einem additiv ansteigenden Wert verrechnet. Die Fluoreszenzen werden F/F_0 korrigiert. Als F_0 wird der Mittelwert der ersten 5 Zeitpunkte gewählt um zufällige Schwankungen zu minimieren. Das Donor Ratio wird berechnet. Zellschicksale werden durch Unterschreitung der Grenzwerte der F/F_0 normierten RFP Fluoreszenz sowie Donor Ratio bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgt durch Plotten der RFP- und Donor Ratio-Werte gegeneinander.

5 Ergebnisse

5.1 Test der Aufreinigungseffizienz der NK Zellen durch FACS

Die Reinheit der aus PBMC negativ aufgereinigten, humanen NK-Zellen wurde via FACS überprüft. Der Hersteller gibt die Reinheit mit 92 % an (Lifetechnologies 2012). Die aufgereinigten Zellen wurden ein Tag nach Isolation mit fluoreszenten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle (cluster of differentiation, CD) gekoppelt (Abb. 3). Um NK-Zellen zu identifizieren, wurde mit CD16 / CD56 markiert. Um die Population gegen T-Zellen abzugrenzen, wurde CD3 / CD4 gefärbt. Zusätzlich wurden intrazelluläres Perforin sowie die Aktivierungsmarker CD62L und CD69 markiert. CD62L bewirkt die Extravasation der im Blut zirkulierenden NK-Zellen (Frey et al. 1998), CD69 korreliert mit erhöhter Zytotoxizität (Clausen et al. 2003).

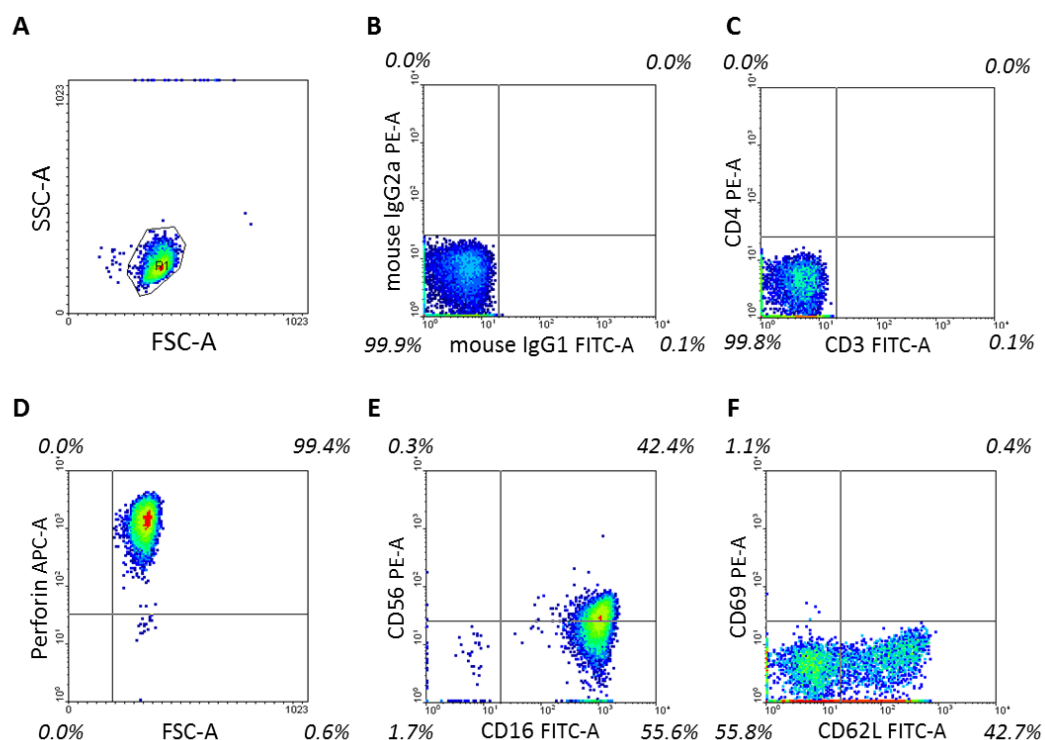


Abbildung 3: Ein Tag nach Isolation hat die NK Population eine Reinheit von 98 %

(A) Zellpopulation isoliert aus PBMC mittels Dynabead® Untouched™ NK Cell Kit im Forward und Side Scatter zur Volumen- und Granularitätsbestimmung. (B) Isotypenkontrolle mit Mausantikörper IgG1 und IgG2a zum Ausschluss unspezifischer Bindung. (C) Zellen sind negativ für CD3 und CD4, demnach keine T-Killerzellen oder T-Helferzellen (D) Zellen sind Perforin-positiv. (E) Nur 1,7 % sind CD56, CD16 negativ. Somit sind 98,3 % der Zellen NK-Zellen. (F) 42,7 % der Zellen exprimieren den Homing-Rezeptor CD62L, sind also bereit, aus dem Blut in umliegendes Gewebe einzuwandern.

Die FACS-Analyse in Abb. 3 zeigt, dass 98 % der Zellen NK-typische CD-Marker exprimieren (Abb. 3E), die Reinheit der Isolation liegt über Herstellerangaben. Eine Verunreinigung durch andere zytotoxische Zellen (T-Zellen) kann ausgeschlossen werden (Abb. 3C).

5.2 Test des IL-2 Einflusses auf primäre, humane NK

Werden die isolierten NK-Zellen unter Standardbedingungen in Kultur gehalten, sinkt drei Tage nach Isolation ihre Viabilität und Zytotoxizität. Um dem entgegenzuwirken, kann dem Medium Interleukin-2 (IL-2) zugesetzt werden, wodurch die NK-Zellen stimuliert werden (Brehm et al. 2011; Koehl et al. 2005). Um die Auswirkungen der Stimulation zu überprüfen, wurden sie per FACS analysiert. Neben den typischen NK-Zellmarkern CD16 und CD56 wurden ebenfalls das zellinterne Perforin und die Aktivierungsmarker CD62L und CD69 antikörpermarkiert. Die Analyse der Zellen erfolgte 8 Tage nach Isolation, die Zellen stammen aus der gleichen Isolation wie die zuvor in der Reinheitsanalyse getesteten Zellen. Die Zellen wurden nach der initialen Analyse aufgeteilt und mit bzw. ohne Interleukin kultiviert (Abb. 4).

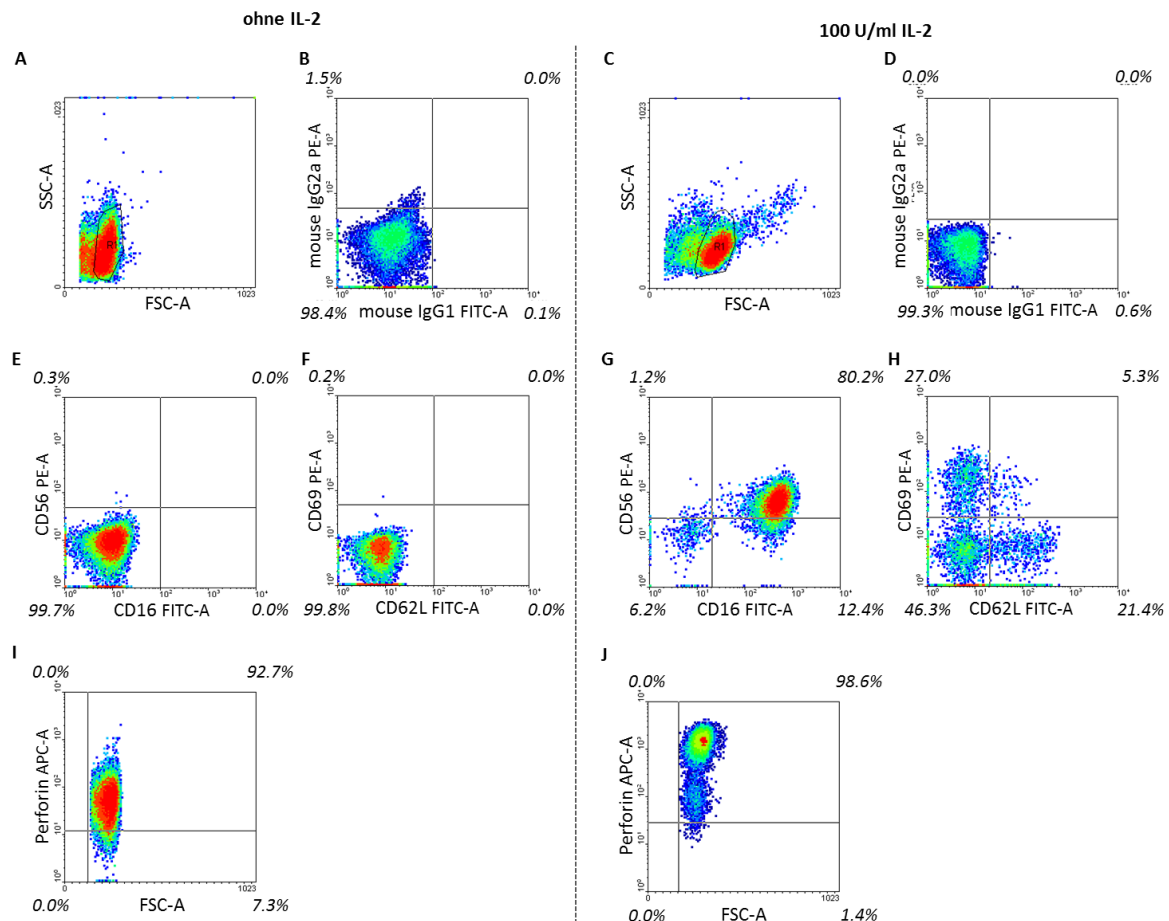


Abbildung 4: IL-2 Stimulation führt zur Differenzierung der NK-Zellen

Nach Isolation wurden die NK-Zellen 8 Tage in getrennten Ansätzen ohne bzw. mit 100 U/ml IL-2 kultiviert. (A,C) Der stimulierte Ansatz ist aufgrund Zelldifferenzierung uneinheitlich in Volumen und Granularität (B,D) Isotypenkontrolle zur Kontrolle unspezifischer Bindung. (E,G) Die unstimulierte Probe exprimiert die typischen NK-Marker CD16 / CD56 nicht mehr. In der stimulierten Probe exprimieren 93,8 % der Zellen die typischen NK-Marker. (F,H) Die Aktivierungsmarker CD62L und CD69 werden in der unstimulierten Probe nicht exprimiert, in der stimulierten Probe exprimieren insgesamt 48,4 % der NK-Zellen einen Aktivierungsmarker (I,J) Das Perforinexpressionslevel ist in der unstimulierten Probe einheitlich niedrig, in der stimulierten Probe existiert eine zweiphasige Population mit der Mehrheit der Zellen auf hohem Expressionslevel.

8 Tage nach Isolation kann die Expression typischer Marker bei unstimulierten NK-Zellen in der FACS-Analyse nicht mehr nachgewiesen werden. Die Aktivierungsmarker zeigen kein Signal, die zellinterne Perforinfärbung weist gegenüber Tag 1 nach Isolation ein deutlich verringertes Expressionslevel nach. Der NK-typische Phänotyp hat sich verändert, es ist keine zytotoxische Aktivität mehr zu erwarten.

Stimuliert man die Zellen mit IL-2, werden die typischen NK-Marker weiterhin exprimiert, das Perforinexpressionslevel erreicht vergleichbare Werte zur initialen Kontrollmessung 24 Stunden nach Transfektion. Die Kontrolle der Aktivierungsmarker zeigt, dass die Population sich differenziert hat. In der initialen Messung an Tag 1 nach

Isolation exprimierten 42 % der Zellen den Homing-Rezeptor CD62L. In der IL-2 stimulierten Population exprimieren 8 Tage nach Isolation nur 21 % der Zellen diesen Rezeptor. Die Expression wurde herabreguliert. Da CD62L für die Extravasation der NK-Zellen aus den Blutgefäßen in sekundäres, lymphatisches Gewebe verantwortlich ist (Rosen 2004), sind die Zellen demnach nun vermehrt darauf ausgerichtet in ihrer aktuellen Umgebung zu verbleiben. Gleichzeitig wurde die Expression von CD69, dem mit erhöhter Zytotoxizität korrelierenden Aktivierungsrezeptor (Bornego, Pena, and Solana 1993), hochreguliert.

Die IL-2 Stimulation führt zur Differenzierung der NK-Zellen zu einem aktivierten Phänotyp mit erhöhter Zytotoxizität.

5.3 Stabile Zelllinie Jurkat E6-1 pCasper und K562 pCasper

Natürliche Killerzellen überprüfen die Oberflächenrezeptorexpression der Zielzellen und greifen diese an, wenn das kumulative Signal aktivierend ist (Vivier et al. 2008). Als Zielzellen werden Zelllinien eingesetzt, die aufgrund ihrer Rezeptorexpression standardmäßig von den NK-Zellen abgetötet werden können. Um insbesondere die Perforin/Granzym-abhängige Zytotoxizität der NK-Zellen zu untersuchen, wurden zwei Zelllinien gewählt, die sich in der Expression des Fas-Rezeptor CD95 unterscheiden, da dieser ebenfalls Apoptose in den Zielzellen induziert. Die Zelllinie Jurkat E6-1 exprimiert CD95 (Caricchio, Reap, and Cohen 1998), die Zelllinie K562 nicht (Owen-Schaub et al. 1995). Um die Apoptose zu detektieren, wurden beide mit dem Sensor Casper3-GR transfiziert. Der GFP-RFP FRET Sensor verändert sein Fluoreszenzratio, sobald er durch Caspase-3 geschnitten wird. Um die Quantität und Qualität des Sensorfeedbacks zu optimieren, wurden monoklonale, stabile Jurkat E6-1 und K562 Zelllinien hergestellt. Mit Hilfe von Carsten Kummerow wurden durch transiente Transfektion, Vereinzelung und Wachstum unter Antibiotikaselektionsdruck die Zelllinien Jurkat E6-1 pCasper und K562 pCasper generiert. Die Zellen dieser Linien sind monoklonal und einheitlich vital. Um die Expression des Casperkonstruktes zu verifizieren, wurden die Zellen per FACS analysiert (Abb. 5).

Jurkat E6-1 / Jurkat E6-1 pCasper:

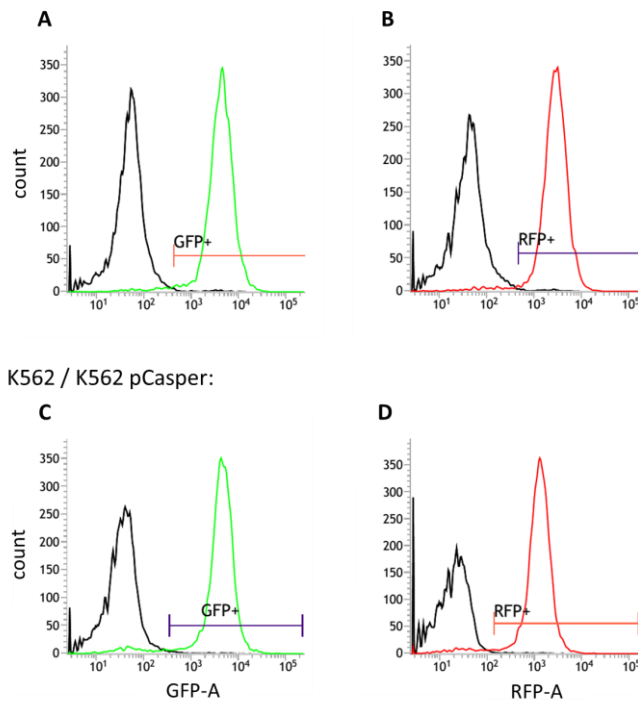


Abbildung 5: Die nach der Fluoreszenzintensität separierten Populationen der Ausgangs- und stabilen Zelllinien trennen sich in der FACS-Analyse auf.

Pro Messung wurden 1×10^5 Zellen analysiert. Es wurde jeweils der GFP- sowie RFP-Kanal gemessen. Populationen der Ausgangszelllinien sind in schwarz abgebildet, pCasper-Zelllinien in grün (GFP) sowie rot (RFP).

Die FACS-Analyse zeigt, dass 93 % der K562 pCasper sowie 96 % der Jurkat E6-1 pCasper fluoreszent sind. Vergleicht man die Fluoreszenz der stabilen Linien gegenüber den Ausgangslinien, trennen sich die Populationen eindeutig auf. Die Fluoreszenz der stabil transfizierten Zellen und ihre Viabilität wurde weiterhin mikroskopisch analysiert (Abb. 6).

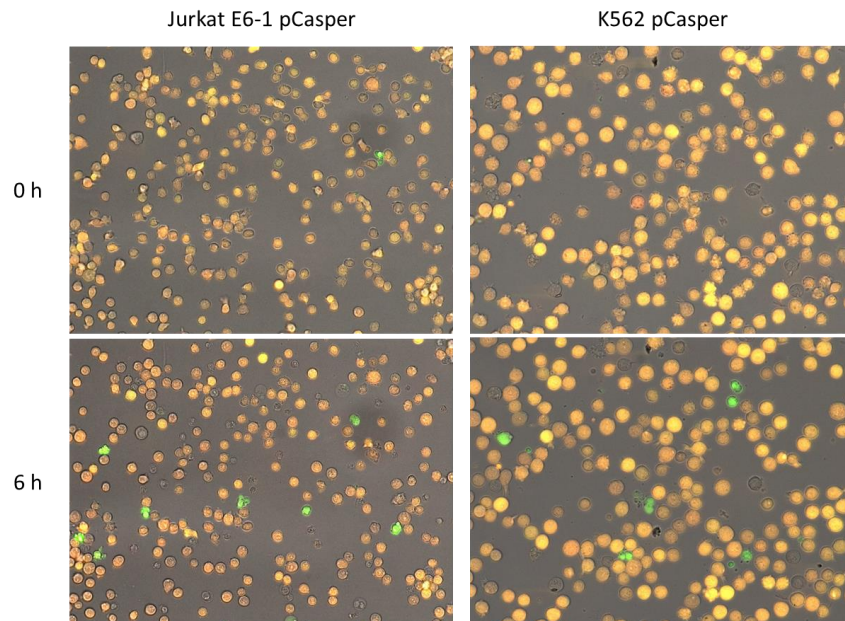


Abbildung 6: Die Viabilität beider Zelllinien unter Mikroskopinkubationsbedingungen liegt bei 6 Stunden über 95 %

Beide Zelllinien wurden in einer 96-Wellplatte über einen Zeitraum von 6 h mit einem Aufnahmeintervall von 5 Min im Durchlicht-, GFP-, RFP- und FRET-Kanal mit einem 20 x-Objektiv gemessen. Apoptotische Zellen erscheinen im Overlay der Kanäle grün.

Die Aufnahmen bestätigen, dass nahezu alle Zellen fluoreszent sind (Zeitpunkt 0 h). Die Anzahl apoptotischer Zellen liegt unter 0,3 %. Nach 6 Stunden Inkubation im Mikroskop (5 %, CO₂, 37 °C, 5 min Aufnahmeintervall) sind 4,1 % der Jurkat E6-1 pCasper und 1,8 % der K562 pCasper apoptotisch. Somit sind 95,9 % der Zellen oder mehr über mindestens 6 Stunden unter Mikroskopinkubationsbedingungen vital.

Zur Verifikation der Funktionalität des Casper3-GR FRET-Apoptosesensors und der CD95-Expression wurden beide Zelllinien mit dem Apoptoseaktivator Staurosporin sowie dem CD95-aktivierenden Antikörper Apo1-1 inkubiert (Abb. 7).

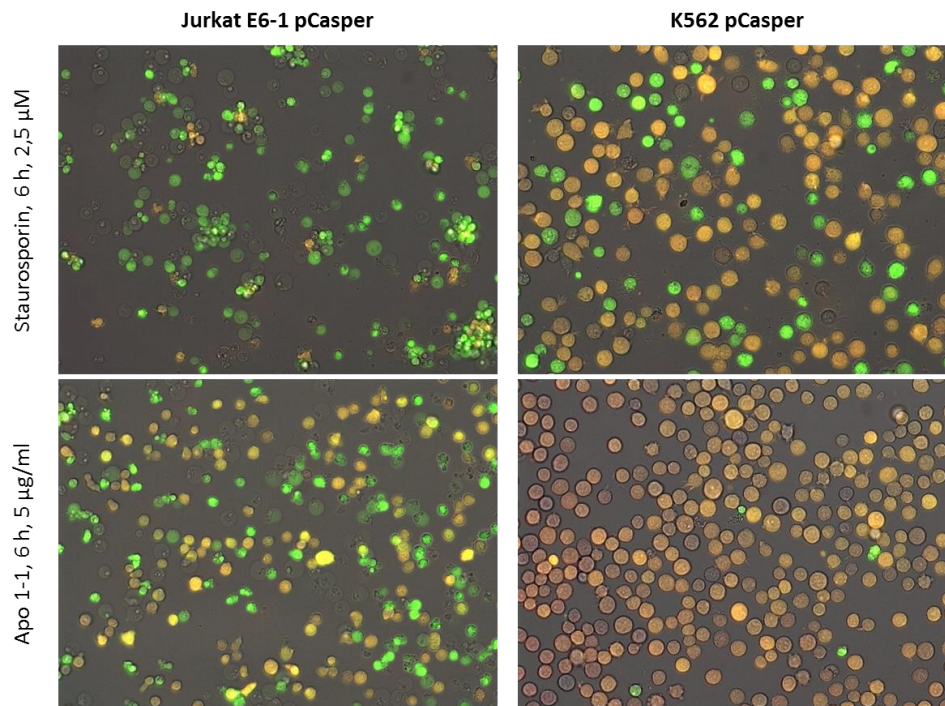


Abbildung 7: Der Casper3-GR Apoptosesensor ist populationsweit funktional in beiden stabilen Zelllinien. Jurkat E6-1 pCasper ist sensitiv für CD95-aktivierenden Antikörper, K562 pCasper nicht. Beide Zelllinien wurden jeweils mit 2,5 µM Staurosporin sowie 5 µg/ml anti-CD95 Antikörper inkubiert und gleichzeitig über 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in 5-minütigem Intervall mikroskopiert.

Abb. 7 zeigt, dass Staurosporin den Zelltod von 91,8 % der Jurkat E6-1 pCasper sowie 32 % der K562 pCasper verursachte. Der Anti-CD95 Antikörper induzierte die Apoptose in 62,7 % der Jurkat E6-1 pCasper, jedoch nur 1,6 % der K562 pCasper waren nach 6 h apoptotisch. Um die Kinetik der Apoptoseinduktion durch die verschiedenen Stimuli darzustellen, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (Abb. 8).

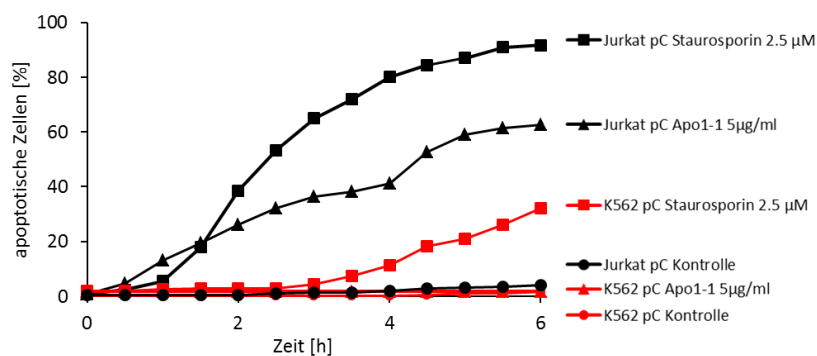


Abbildung 8: Kinetik der Apoptoseinduktion in beiden stabilen Zelllinien über 6 h durch Staurosporin und CD95 Antikörper Apo 1-1

Die Zellen wurden mit 2,5 µM Staurosporin bzw. 5 µg/ml CD95-aktivierendem Antikörper (Apo1-1, Enzo) über 6 Stunden inkubiert und mikroskopiert. Im 30-minütigen Intervall wurde die Anzahl apoptotischer Zellen durch visuelle Analyse des Ratio-Umschlages ausgezählt.

Abb. 8 zeigt, dass Jurkat E6-1 pCasper im Vergleich zu den K562 pCasper deutlich sensibler auf die Apoptoseinduktion durch Staurosporin reagieren. Der Sensor wird nach Apoptoseinduktion in beiden Zelllinien geschnitten. Durch den CD95 aktivierenden Antikörper Apo 1-1 wird die Apoptose ausschließlich in den Jurkat pCasper induziert. Der CD95 abhängige Signalweg ist daher ausschließlich in den Jurkat pCasper funktional, in den K562 pCasper nicht. Zur Verifikation der CD95 Defizienz der K562 wurde eine qRT-PCR sowie ein FACS-Nachweis des CD95 durchgeführt.

5.4 CD95 Nachweis in den Zielzellen

5.4.1 CD95 Analyse per qRT-PCR

Der Fas-Rezeptor CD95 hat eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Apoptose in Zielzellen. Die Linie Jurkat E6.1 ist laut Literatur CD95-positiv (Caricchio, Reap, and Cohen 1998), die Linie K562 negativ (Munker et al. 1997). Um dies zu verifizieren wurden beide Zelllinien mittels qRT-PCR mit Hilfe von Gertrud Schwär überprüft (Tabelle 10).

Tabelle 6: qRT-PCR-Nachweis der CD95 mRNA in Jurkat E6-1 und in K562, $2^{-\Delta C_q}$ Werte

	CD95_PP1/TBP	CD95_PP1/RNAPol	CD95_PP2/TBP	CD95_PP2/RNAPol
K562	0.000053	0.000075	0.000382	0.000539
K562 pCasper	0.000109	0.000148	0.000934	0.00127
E6.1	0.1475	0.0866	1.0151	0.5964
E6.1 pCasper	0.1497	0.097	1.0588	0.6857

Die qRT-PCR wurde zur Kontrolle mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt und gegen zwei unterschiedliche Haushaltsgene normalisiert. Die $2^{-\Delta C_q}$ Werte zeigen, dass CD95-mRNA in der Jurkat E6-1 Zelllinie vorhanden ist, in der K562-Zelllinie hingegen nicht.

5.4.2 CD95 Analyse per FACS

Aufbauend auf die Kontrolle der CD95 mRNA-Level in den Jurkat- und K562-Zelllinien wurde die Expression auf Proteinebene per FACS kontrolliert. Proben der vier Zelllinien wurden entnommen und mit einem fluoreszenzgekoppelten, anti-CD95 Antikörper

inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde gegen ungefärbte Proben und Inkubationen mit Antikörperisotypen verglichen (Abb. 9). Die Überprüfung dient zur Verifikation der Expression von CD95 auf Proteinebene analog der mRNA-Level.

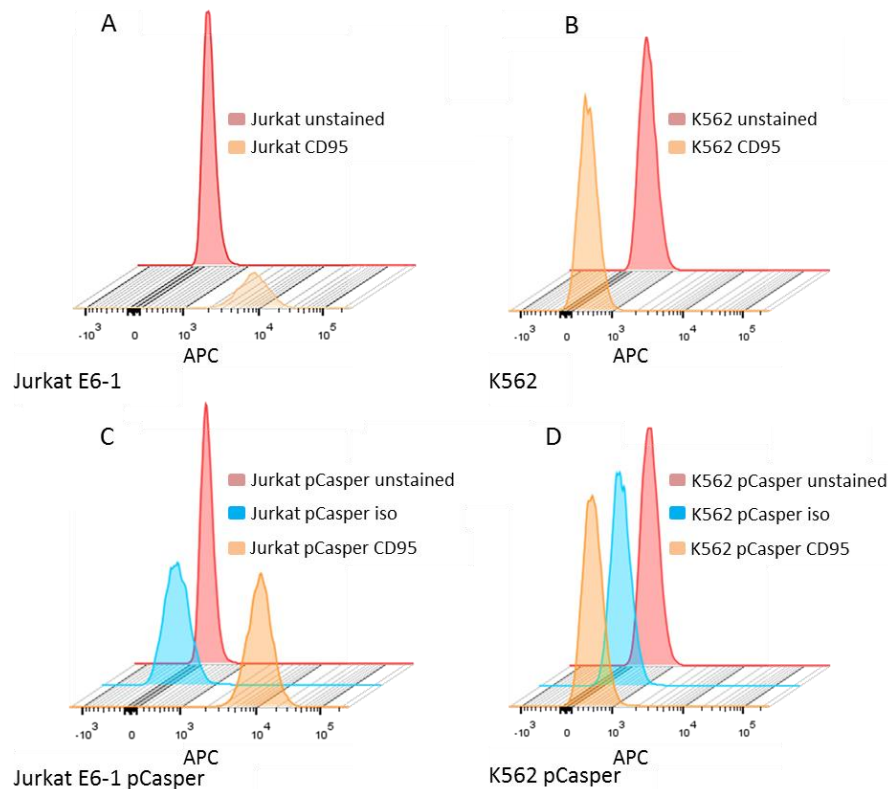


Abbildung 9: FACS-Nachweis der CD95 Expression bei Jurkat E6-1, Jurkat E6-1 pCasper, K562 und K562 pCasper

Die Zelllinien Jurkat E6-1, K562 und sowie Jurkat E6-1 pCasper und K562 pCasper wurden mittels FACS auf CD95 Expression überprüft.

Abb. 9A, 9C: Jurkat E6-1 und Jurkat E6-1 pCasper exprimieren CD95, beide Zelllinien zeigen ein CD95 Fluoreszenzsignal (gelbe Populationen), dass sich deutlich von den ungefärbten Kontrollen (rot) und der Isotypkontrolle (blau) abhebt. Die Amplitude der gelben Population erscheint geringer im Vergleich zu den übrigen, da in der ungefärbten Kontrolle deutlich mehr Zellen gemessen und die Populationen skaliert wurden.

Abb. 9B, 9D: K562 und K562 pCasper exprimieren CD95 nicht, die gefärbten Populationen (gelb) haben die gleiche Fluoreszenzintensität wie die ungefärbten Kontrollen (rot) und die Isotypenkontrolle (blau).

Die Kontrolle der CD95 Expression via FACS zeigt demnach, dass die Jurkat Zelllinie CD95 exprimiert, K562 nicht. Die stabilen, monoklonalen pCasper Zelllinien exprimieren CD95 analog zu den Stammzelllinien. Veränderungen durch zufällige Mutation der

monoklonalen Linien können ausgeschlossen werden. Die FACS-Ergebnisse bestätigen auf Proteinebene die Ergebnisse der qRT-PCR mRNA Analyse und dem Funktionstest mittels CD95 aktivierendem Antikörper.

5.5 FRET Donor Ratio, Korrekturfaktoren

FRET ist ein distanzabhängiger, physikalischer Prozess, bei dem Energie von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor übertragen wird. Neben der gewünschten FRET-Fluoreszenz kommt es durch die überlappenden Spektren zu Signalverunreinigungen, dem sogenannten Donor-bleedthrough und dem Akzeptor-crosstalk. Als Donor-bleedthrough bezeichnet man Fluoreszenz des Donors im FRET-Emissionsspektrum. Der Akzeptor-crosstalk bezeichnet die direkte Anregung des Akzeptors im Exzitationspektrum des Donors statt durch FRET. Abbildung 10 zeigt die Spektren beider Fluorophore sowie Crosstalk und Bleedthrough.

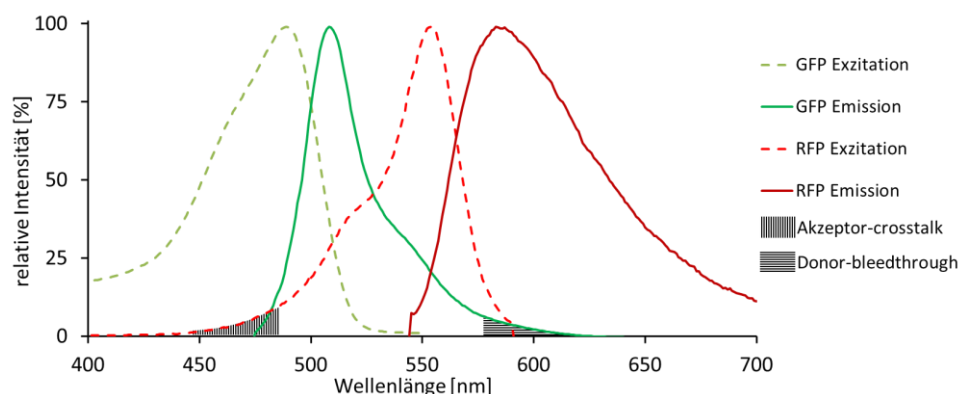


Abbildung 10: Akzeptor-crosstalk und Donor-bleedthrough des tagGFP-tagRFP-FRET Paares

Zur Messung werden die Filtersets 38 HE sowie 45 von Zeiss eingesetzt. Das Anregungsspektrum des 38 HE liegt bei 450 bis 490 nm, wodurch ebenfalls das FRET-Akzeptorfluorophor tagRFP angeregt wird. Die Emission des Filtersets 45 beginnt bei 592 nm. Im FRET-Fluoreszenzkanal wird ebenfalls ein Anteil des direkt angeregten tagGFP als Donor-Bleedthrough gemessen. Spektralinformationen exportiert aus SpectraViewer, ThermoFischer.

Um beide Signalverunreinigungen zu bestimmen, werden Einzeltransfektionen mit tagGFP und tagRFP durchgeführt. Beide Proben werden im Donor-, Akzeptor- und FRET-Kanal gemessen (Abb. 11). Die Fluoreszenzintensität der tagGFP-Probe im FRET-Kanal gibt Aufschluss über den Donor-bleedthrough. Das Signal des tagRFP im FRET-Kanal gibt den Akzeptor-crosstalk an.

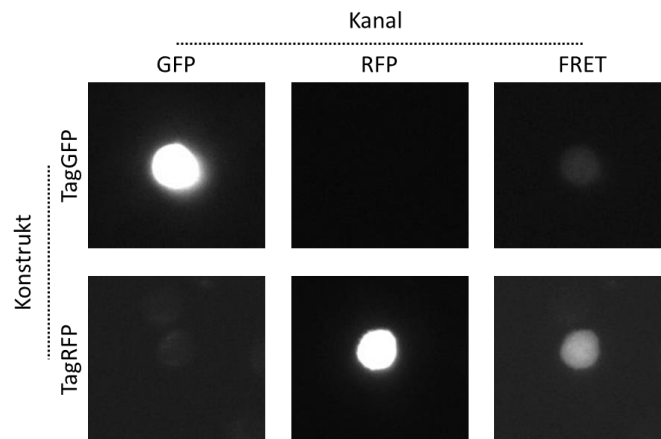


Abbildung 11: Der Donor-bleedthrough ist geringer als der Akzeptor-crosstalk

Die Konstrukte TagGFP und TagRFP wurden transient in Jurkat E6-1 pCasper transfiziert. Alle Kanäle wurden mit identischer Belichtungszeit und LED-Intensität mit einem 20 x Objektiv gemessen. Die Messungen enthalten jeweils > 5 transfizierte Zellen. Beispielhaft wird je eine transfizierte TagGFP- und TagRFP-Zelle dargestellt. Die Graustufendarstellung aller Kanäle wurde gleich skaliert. Die Fluoreszenz im FRET-Kanal im Vergleich zum jeweils nativen Fluoreszenzkanal des Konstrukts ist der Donor-bleedthrough bzw. Akzeptor-crosstalk.

Der Vergleich zeigt, dass der Donor-bleedthrough deutlich geringer ist als der Akzeptor-crosstalk. Zur Quantifizierung wurde das Plugin „FRET and Colocalization Analyzer“ für ImageJ eingesetzt. Das Programm vergleicht pixelgenau den prozentualen Anteil der Störsignale im FRET-Kanal mit der Fluoreszenz der Einzelkonstrukte im jeweils nativen Fluoreszenzkanal.

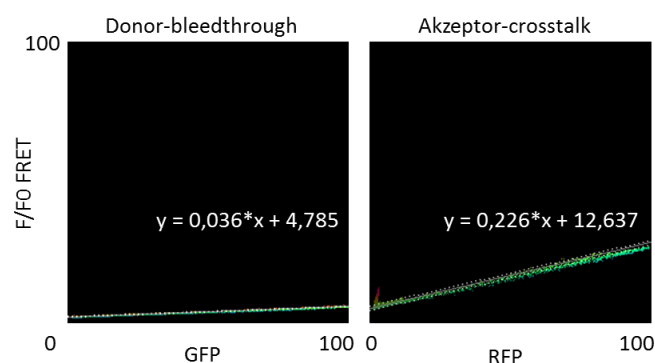


Abbildung 12: Der Donor-bleedthrough beträgt 3,6 %, der Akzeptor-crosstalk 22,6 %.

Die Pixelintensitäten im FRET-Kanal wurden mit den Pixelintensitäten des nativen Fluoreszenzkanals verglichen. Die Fluoreszenzintensitäten jedes Pixels im FRET-Kanal wurden mit dem korrespondierenden Pixel des nativen Fluoreszenzkanals korreliert und geplottet. Die Steigung der Gerade gibt den prozentualen Anteil Donor-bleedthrough bzw. Akzeptor-crosstalk am FRET-Signal an. Der Pearson Korrelationskoeffizient beträgt für den Donor-bleedthrough 0,768 und für den Akzeptor-crosstalk 0,805.

Der Plot der Pixelintensitäten zeigt, dass der Donor-bleedthrough 3,6 % beträgt, der Akzeptor-crosstalk 22,6 % (Abb. 12). Dies bedeutet, dass von 100% FRET Signal 3,6% aus unerwünschter GFP-Emission und 22,6% aus ungewünschter RFP Anregung stammen. Um das tatsächliche FRET Signal zu berechnen, müssen diese Signale abgezogen werden.

Unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren kann nun das FRET Donor-Ratio berechnet werden. Zunächst werden die FRET-Werte nach Youvan berechnet (Youvan, Silva, and Bylina 1997). In dieser Berechnung werden sowohl der Donor-bleedthrough (cf_{don}) als auch der Akzeptor-crosstalk (cf_{acc}) berücksichtigt.

$$F_c = (Ch_{fret} - BG_{fret}) - (Ch_{don} - BG_{don}) * cf_{don} - (Ch_{acc} - BG_{acc}) * cf_{acc}$$

Die Formel bereinigt zunächst den FRET-Kanal vom Hintergrund und zieht anschließend die hintergrundbereinigten Fluoreszenzanteile des Donor-bleedthrough und des Akzeptor-crosstalk ab (lineares unmixing). Das Ergebnis sind intensitätsabhängige Grauwerte.

Anschließend wird das FRET-Donor Ratio (F_{DN}) berechnet, indem F_c durch die Donor-Werte geteilt wird. Die Werte dieser Berechnung sind intensitätsunabhängig.

$$F_{DN} = \frac{F_c}{Ch_{don} - BG_{don}}$$

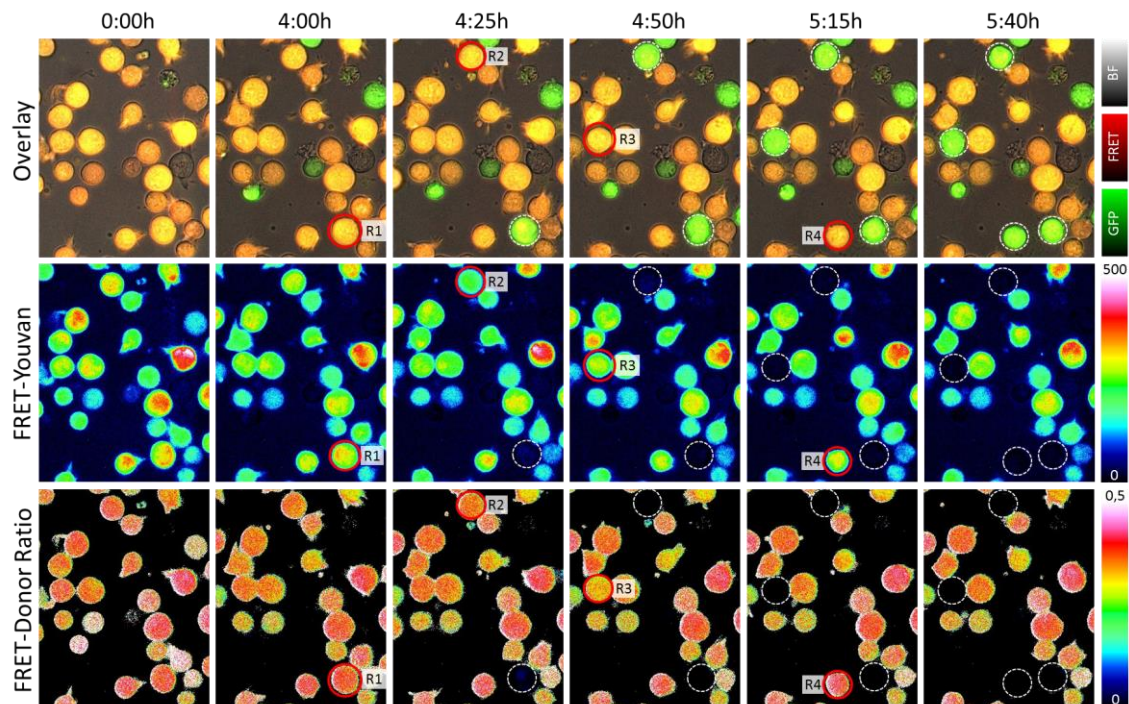


Abbildung 13: Vitale und apoptotische K562 pCasper im Overlay, FRET nach Youvan und FRET Donor Ratio

K562 pCasper wurden 6 h mit $2,5 \mu\text{M}$ des Apoptoseinduktor Staurosporin inkubiert. Im Overlay werden apoptotische Zellen grün, in den berechneten FRET-Kanälen schwarz. Die Pixelwerte beider FRET-Berechnungen werden mit einer Falschfarbenanzeige (Look Up Table, LUT) dargestellt. Die genutzte rainbow-LUT zeigt niedrige Werte in dunkelblau bis schwarz, hohe in rot bis weiß. In beiden FRET-Berechnungen ist das Ratio apoptotischer Zellen nahe null, sodass diese Zellen schwarz dargestellt werden. In der Berechnung nach Youvan (F_C) sind die Maximalwerte intensitätsabhängig. Vitale Zellen sind grün bis rot farbkodiert. Die Berechnung des Donor-Ratio (F_{DN}) ist intensitätsunabhängig und gleicht die Werte vitaler Zellen an. Im berechneten Donor-Ratio sind vitale Zellen rot bis weiß.

R1 bis R4 markieren beispielhaft apoptotische Zellen. Sowohl in der FRET Berechnung nach Youvan als auch im Donor-Ratio sinken die Pixelwerte apoptotischer Zellen auf 0 und die rainbow-LUT zeigt die Zellen schwarz (Abb. 13). Zellen können per ROI definiert und der Durchschnittswert des FRET-Donor Ratio über Zeit bestimmt werden.

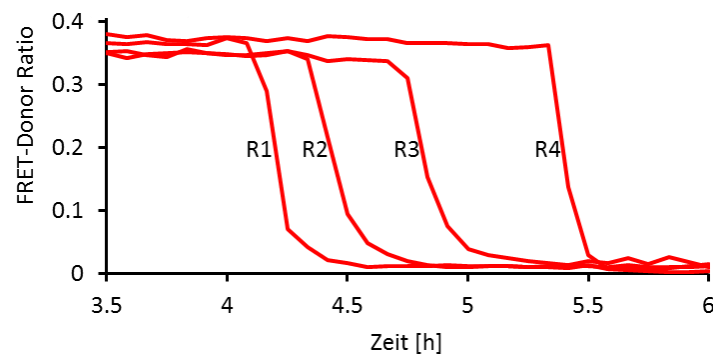


Abbildung 14: Der durchschnittliche Grauwert apoptotischer Zellen sinkt im FRET-Donor Ratio nahe 0

Die durchschnittlichen FRET-Donor Ratios der vier apoptotischen K562 pCasper aus Abb. 13 wurden bestimmt. Das Aufnahmeintervall beträgt 5 min, die Gesamtdauer des Experimentes 6 h. Die Zellen wurden mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) inkubiert. Die FRET-Donor Ratio vitaler Zellen sind konstant und liegen bei ca. 0,38, da in vitalen Zellen der GFP-Donorkanal 3-fach höhere Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zum FRET-Kanal erzeugt.

Wird die Zelle apoptotisch, fällt das FRET-Donor Ratio. Caspaseinduzierte Fluoreszenzumschläge sind durch Analyse der Unterschreitung des halbmaximalen Ratiowertes objektiv bestimmbar.

5.6 Analyse eines Casper3-GR Kontrollkonstrukts

Das zur Kontrolle der Caspase 3 Bindestelle neu generierte Konstrukt mit insensitiver DEVA-Bindestelle (Fang et al. 2006) wurde transient in Jurkat E6-1 transfiziert und nach 24 Stunden mikroskopiert (Abb. 15).

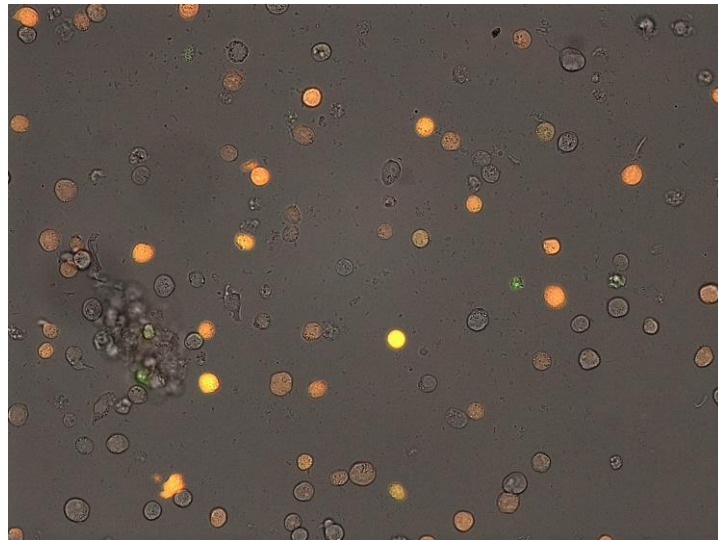


Abbildung 15: Das mutierte Casper3-GR mit DEVA Bindestelle wird von den Zellen exprimiert und ist fluorescent

Das mutierte Casper3-GR Konstrukt erreichte nach 24 h Expressionsphase eine Transfektionseffizienz von 54 %. Die Zellen wurden auf einen fibronectingecoateten Coverslip abgesessen und mit 0,5 mM Kalziumlösung überschichtet. Sie wurden mit 2,5 µg Apo 1-1 Antikörper sowie in einem getrennten Ansatz mit 10 µM Staurosporin inkubiert und 3 h in einem Intervall von 10 s mikroskopiert.

Das mutierte Casper3-GR wird von den Jurkat E6-1 exprimiert und ist fluorescent. Die FRET-Fluoreszenz wurde durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Die transfizierten Zellen sind im Overlay orange, das DEVA-FRET-Konstrukt ist ungeschnitten. Zur funktionellen Analyse wurden die Zellen 3 Stunden mikroskopiert und mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin sowie in einem getrennten Ansatz mit dem CD95-aktivierenden Antikörper Apo 1-1 inkubiert (Abb. 16).

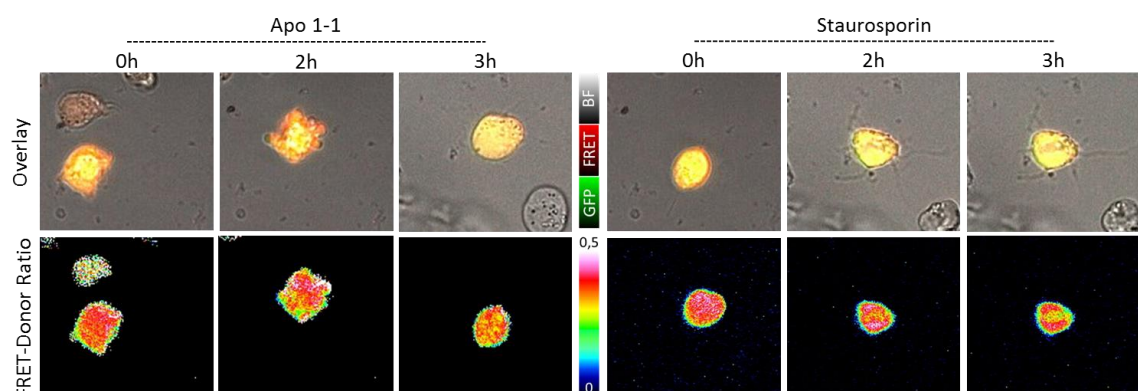


Abbildung 16: In dem mutierten Casper3-GR mit DEVA Bindestelle verändert sich das Fluoreszenz-ratio während der Apoptose nicht.

DEVA-Casper3-GR transfizierte Zellen wurden über 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mikroskopiert und mit 2,5 µg/ml CD95-aktivierendem Antikörper Apo 1-1 und im getrennten Ansatz mit 10 µM Staurosporin inkubiert. Pro Ansatz wurden beispielhaft zwei morphologisch eindeutig apoptotische Zellen ausgewählt und im Overlay sowie FRET-Donor Ratio für Zeitpunkte vor der Apoptose (0 h), währenddessen (2 h) und danach (3 h) dargestellt.

In beiden Ansätzen zeigten die Zellen durch Apoptosen bedingte, eindeutige Veränderungen der Zellmorphologie. Die Membran der Apo 1-1 inkubierten Zellen blebte, im Staurosporinansatz schrumpften die Zellen und die Bewegung von Zellorganellen stoppte. Das Fluoreszenzratio veränderte sich in beiden Fällen nicht, im Overlay erscheinen die Zellen weiterhin orange, im Ratiobild rot (Abb. 16).

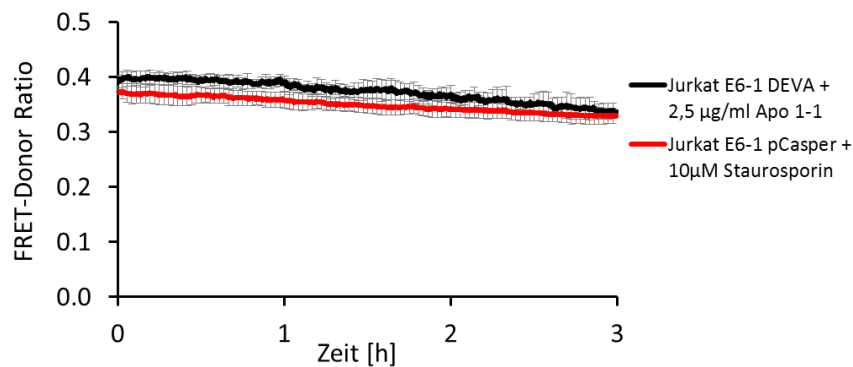


Abbildung 17: Das DEVA-mutierte FRET-Konstrukt wird während der Apoptose nicht mehr gespalten.

Pro Ansatz wurden 10 morphologisch eindeutig apoptotische Zellen per ROI markiert und ihr FRET Donor-Ratio berechnet. Der Mittelwert samt Standardabweichung wurde berechnet. Das Aufnahmeintervall betrug 10 s.

Das FRET-Donor Ratio fällt über 3 Stunden aufgrund erhöhten Bleichens durch das verkürzte Aufnahmeintervall minimal ab. Eine Verschiebung des Fluoreszenzratios findet nicht statt (Abb. 17). Durch die Mutation der Erkennungssequenz der Caspase-3 Schnittstelle wurde das FRET Konstrukt während der Apoptose nicht mehr geschnitten und das Ratio der Fluoreszenzen blieb gleich. Durch diese Kontrollversuche wurde die Spezifität des Sensors bestätigt.

5.7 Detektion von Nekrosen

Ein entscheidender Unterschied zwischen Nekrosen und Apoptosen ist die Membranzerstörung der Zielzelle (Kroemer et al. 2009) Um Nekrosen zu identifizieren, werden zytosolische, nicht membrangängige Farbstoffe eingesetzt. Anschließend wird das Fluoreszenzverhalten des FRET-Caspasesensors bei Nekrosen verifiziert.

Die genutzten Farbstoffe sind Calcein-AM, Fura-2 und Propidiumiodid (PI). Alle drei Farbstoffe sind in ihrem fluoreszenten Zustand nicht membrangängig. Überquert ein

Farbstoff die Membranbarriere, muss dies durch eine physikalische Öffnung geschehen, sodass er entlang seines Konzentrationsgradienten diffundieren kann.

Die Funktion von Calcein und Fura-2 in diesem Experiment ist redundant, jedoch kann Calcein nicht parallel zum Casper3-GR Sensor gemessen werden, da sich Exzitation und Emission von Calcein mit GFP überlagern. Das bereits im Populationskillingassay etablierte Calcein (Kummerow et al. 2014) wird daher zunächst mit Fura-2 verglichen. Anschließend wird Fura-2 gemeinsam mit Casper3-GR eingesetzt. Fura-2 wird nicht, wie traditionell üblich, als ratiometrischer Kalziumindikator genutzt, sondern am isosbestischen Punkt bei 360 nm angeregt und kalziumunabhängig als zytosolischer, schnell diffundierender Farbstoff eingesetzt.

PI ist ein generell nicht membrangängiger Farbstoff, der seine Fluoreszenz 20-fach erhöht, wenn er in DNA oder RNA interkaliert. Er wird in das Medium gegeben und erhöht zunächst ausschließlich die Hintergrundfluoreszenz. Nur durch eine physikalische Öffnung der Zellmembran kann er in die Zelle eindiffundieren und daraufhin in DNA oder RNA interkalieren. Dies erhöht seine Fluoreszenz um das 20-fache.

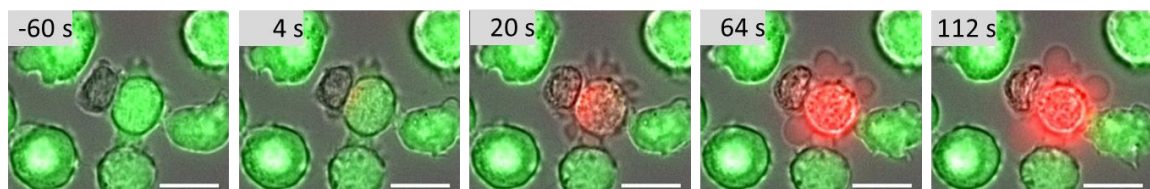


Abbildung 18: Während der Nekrose entsteht eine physikalische Öffnung der Zielzellmembran, durch welche Farbstoffe aus- und eindiffundieren

Jurkat E6-1 wurden mit 500 nM Calcein-AM geladen und auf einem poly-Ornithin gecoateten Coverslip adhärirt. Der extrazelluläre; 0,5 mM CaCl_2 Puffer wurde mit 100 μM PI versetzt. Zeitpunkt 0 s wurde auf den Zeitpunkt normiert, bei dem das Calceinsignal der Zielzelle erstmalig um mehr als 1 % gesunken ist. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μm .

In Abb. 18 bildet die NK-Zelle nach Absinken eine immunologische Synapse mit der Zielzelle aus (-60 s). Bei der Nekroseinduktion sinkt das Calceinsignal, PI dringt in die Zelle ein und wird sichtbar. Der Calceinverlust und die PI-Intensivierung verlaufen antiparallel (4 s bis 112 s). Wenn NK-Zellen die Zielzellen durch Nekrose abtöten, entsteht in der Zielzelle eine physikalische Membranöffnung. Durch diese diffundieren zytosolische Farbstoffe schlagartig aus und externe ein. Zur quantitativen Analyse und Unter-

suchung der Diffusionskinetik beider Farbstoffe wurden nekrotische Zielzellen per ROI markiert und ihre Fluoreszenzwerte ausgelesen (Abb. 19).

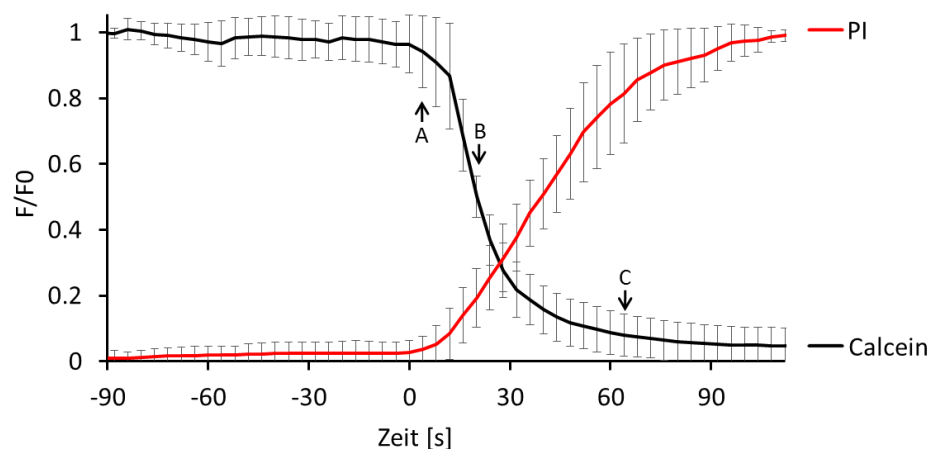


Abbildung 19: Parallel zum Calceinverlust strömt PI in die Zielzelle ein

Der mittlere Grauwert der Calcein- sowie PI-Fluoreszenz von sieben nekrotischen Zellen wurde bestimmt. Die Werte wurden hintergrundbereinigt, F/F_0 intensitätsnormiert sowie zeitlich auf den Messpunkt, bei dem die Calceinfluoreszenz 50 % beträgt (B). Der Mittelwert beider Fluoreszenzen \pm Standardabweichung (SD) wurde bestimmt. Im Zeitraum -90 s bis -30 s ändert sich der Fluoreszenzwert des Calcein im Durchschnitt um 0,58 % mit einer SD von $\pm 0,4$ %. (A) Als Beginn der Nekrose wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig um mehr als 1 % fällt. (B) Trotz nahezu identischer Molekulargewichte der Farbstoffe (MW (Calcein) = 622,55 g/mol; MW (PI) = 668,4 g/mol) steigt die PI-Fluoreszenz langsamer als die des Calceins sinkt. Im Unterschied zur reinen Ausdiffusion von Calcein muss PI nach Einstrom in die Zelle zunächst in DNA oder RNA interkalieren, bevor es detektiert wird. Dies erklärt die verzögerte PI-Kinetik. (C) Das Ende der Nekrose wurde analog des Beginns bestimmt.

Während der Nekrose kommt es innerhalb von 64 Sekunden zum nahezu vollständigen Verlust zytosolischer Fluoreszenz, während der externe Farbstoff PI dazu korrelierend einströmt. Rein mechanistisch wird die Nekrose durch zytotoxische Vesikel ausgelöst, die von der NK-Zelle an der immunologischen Synapse (IS) exozytiert werden. Diesem Modell entsprechend sollte die Membrandisruption an der IS entstehen, da das in den zytotoxischen Vesikeln enthaltene Perforin dort mit der Membran der Zielzelle interagiert. Um dies zu überprüfen wurden die Exzitationszeiten und -intensitäten auf eine sensible Detektion schwacher PI Signale optimiert (Abb. 20), starke PI Signale erscheinen gesättigt.

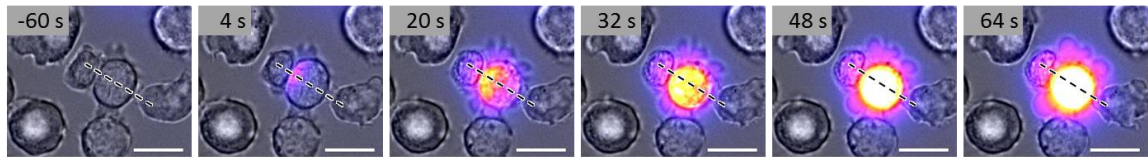


Abbildung 20: Der Gradient des PI-Einstroms beginnt an der IS.

Die PI-Fluoreszenzwerte wurden per fire-LUT farbkodiert und die Grauwerte mittels Liniendiagramm analysiert. Die Linie beginnt in der NK-Zelle, verläuft über die IS in die Zielzelle und endet dahinter. Maßstab = 10 μm

Vor der Nekrose (-60 s) ist in der Zielzelle keine Fluoreszenz detektierbar. Während der Nekrose beginnt der Gradient an der IS (4 s) und diffundiert von dort in die Zielzelle ein (4 bis 64 s), bis eine Sättigung erreicht ist. Der an der IS beginnende PI-Diffusionsgradient ist ein direkter Nachweis der Membrandisruption an der IS. Die Quantifizierung erfolgt durch Analyse der Fluoreszenzveränderung entlang der Linie über Zeit (Abb. 21).

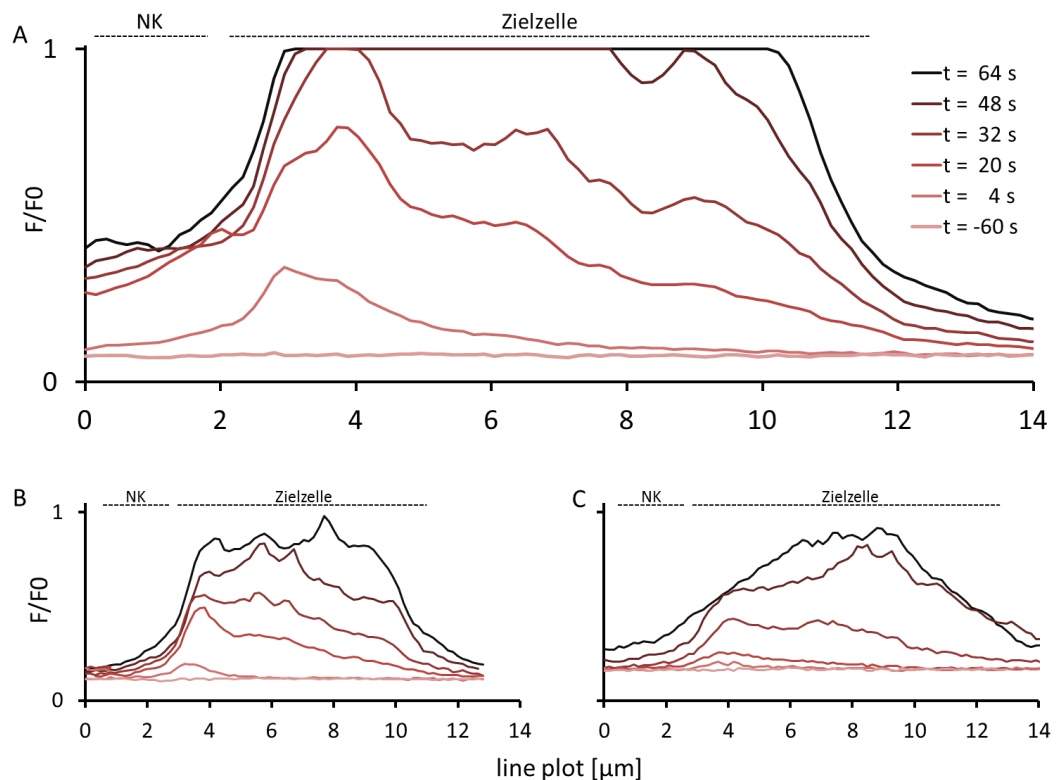


Abbildung 21: Die PI-Fluoreszenz der Zielzelle steigt zunächst lokal an der IS an und diffundiert von dort in die Zelle

Liniendiagramm der Zielzelle aus Abb. 20 zu sechs verschiedenen Zeitpunkten. Der Plot beginnt innerhalb der NK-Zelle (0 μm - 1 μm), verläuft durch die IS (bei 2 μm), die Zielzelle (2,5 μm bis 10 μm) und endet hinter dieser.

(Abb. 21A) Vor der Nekrose ($t = -60$ s) zeigt der Plot ausschließlich Hintergrundfluoreszenz. Zu Beginn der Nekrose ($t = 4$ s) steigt die Fluoreszenz lokal im Bereich der IS an. Der lokale Peak steigt weiter und sättigt ab $t = 32$ s den Kamerachip. Das Zytosol der Zelle wird von der IS aus gesättigt. Abb. 21B und 21C zeigen beispielhaft zwei weitere Nekrosen. Die Diagramme belegen den Eintritt des PI in die Zielzelle an der IS und somit die dortige, physikalische Membranöffnung. Der zytosolische Fluoreszenzverlust als Nekrosenachweis soll mit dem Verhalten des Apoptosesensors Casper3-GR korreliert werden. Um sicherzustellen, dass sich Fura-2 während einer Nekrose analog zu Calcein verhält, wird zunächst die Diffusion beider Farbstoffe verglichen (Abb. 22).

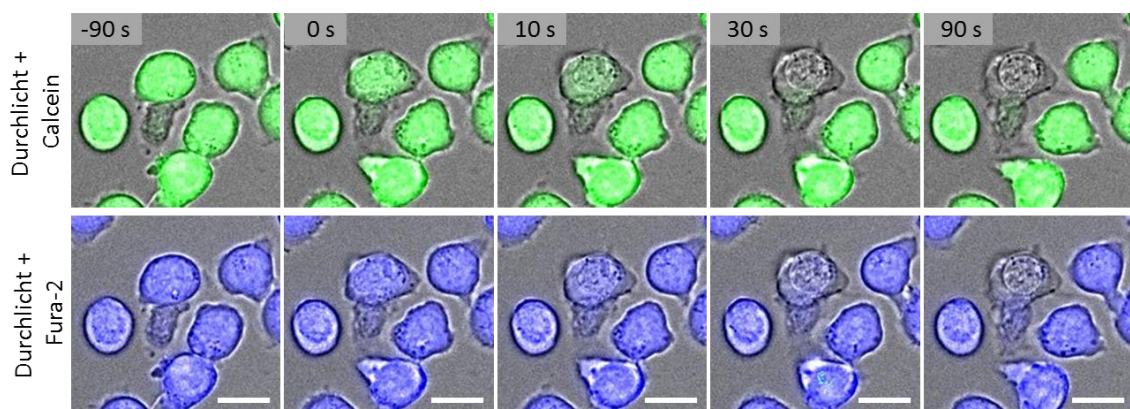


Abbildung 22: Fura-2 als zytosolischer Farbstoff ist redundant zu Calcein

Jurkat E6-1 wurden mit Calcein und Fura-2 geladen und in CaCl_2 auf einem poly-Ornithin gecoateten Coverslip mikroskopiert.

In Abb. 22 bilden die NK-Zellen nach Absinken Synapsen mit den Zielzellen (-90 s). Nach dem Auslösen der Nekrose (0 s) verliert die Zielzelle sowohl die Calcein- als auch Furafluoreszenz ($10 - 90$ s). Zur Quantifizierung wurden Zellen per ROI markiert und die Calcein- sowie Fura-2 Fluoreszenz verglichen (Abb. 23).

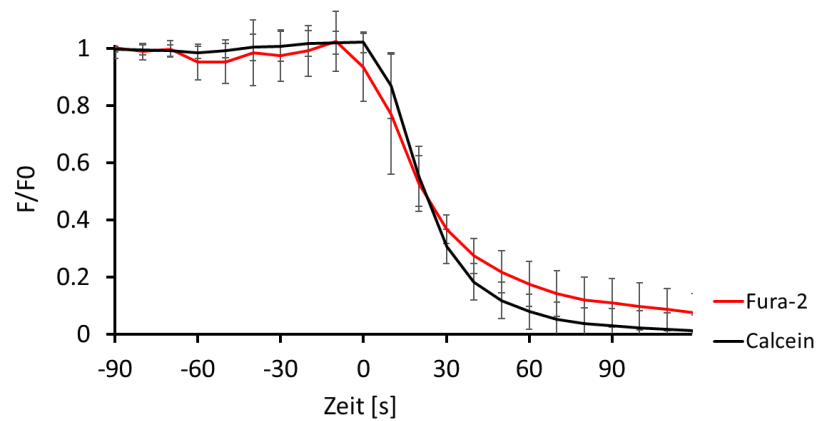


Abbildung 23: Die Kinetik des Fura-2 Fluoreszenzverlustes während der Nekrose ist vergleichbar mit Calcein

Die mittleren Grauwerte der Calcein- sowie Fura-2 Fluoreszenz von fünf nekrotischen Zellen wurden zeitlich (50 % Calceinfloureszenz) und intensitätsnormiert (F/F_0). Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden bestimmt. Die Schwankung der Calceinfloureszenz vor der Nekrose (- 90 s bis - 30 s) beträgt $0,52 \pm 0,34\%$. Zeitpunkt 0 s wurde bei mehr als 1% Calceinverlust definiert.

Abb. 23 zeigt, dass sowohl Calcein als auch Fura-2 durch die nekroseinduzierte Membranöffnung aus der Zielzelle ausströmen. Ihre Kinetik ist nahezu gleich, die geringe Verzögerung der Fura-2 Ausdiffusion könnte sich durch das leicht höhere Molekulargewicht erklären (Calcein = 622,55; Fura-2 = 636,5 g/mol). Es ist somit möglich, Fura-2 als Nekroseindikator einzusetzen und dessen Fluoreszenzverhalten in Folge mit dem Verhalten des FRET-Apoptosesensors Casper3-GR zu korrelieren. Zu diesem Zweck wurde Fura-2 in Jurkat E6-1 pCasper geladen und gemeinsam mit NK-Zellen mikroskopiert (Abb. 24).

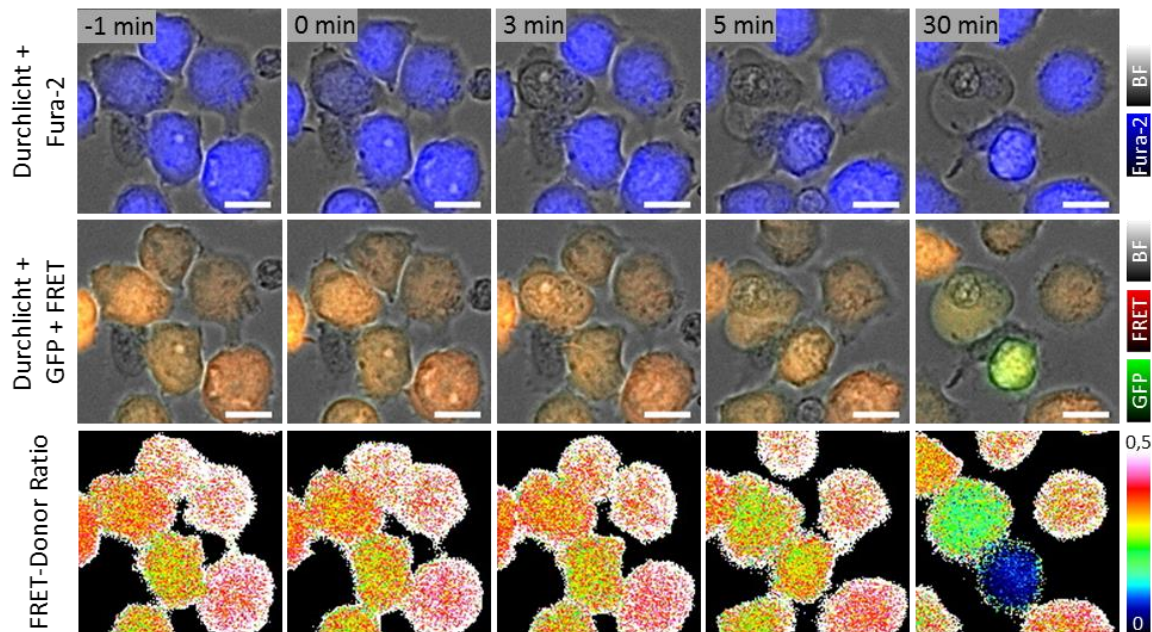


Abbildung 24: Casper3-GR zeigt bei Nekrosen ein eindeutiges Diffusionsverhalten und erlaubt die sichere Unterscheidung zu Apoptosen

Jurkat E6-1 pCasper wurden mit Fura-2 geladen und gemeinsam mit NK-Zellen mikroskopiert. Maßstab = 10 μm .

In Abb. 24 wurden Nekrosen durch den rapiden Fura-2 Verlust identifiziert (0 – 3 min). Casper3-GR zeigt bei Nekrosen ebenfalls einen generellen Fluoreszenzverlust durch Ausdiffusion, jedoch mit verlangsamter Kinetik (0 – 30 min). Das Ratio der GFP/FRET-Fluoreszenz ändert sich gering (30 min). Bei einer Apoptose wird der FRET-Sensor wie erwartet geschnitten, das Fluoreszenzratio verschiebt sich deutlich, die Fura-2 Fluoreszenz bleibt erhalten und wird durch das Schrumpfen apoptotischer Zellen intensiviert (30 min).

Bei einer Nekrose verhält sich der Casper3-GR Sensor analog zu Fura-2, die Fluoreszenz sinkt durch Ausdiffusion im GFP- und FRET-Kanal. Eine deutliche Verschiebung des Donor-Ratio findet nicht statt. Zur Quantifizierung wurden je 5 apoptotische sowie nekrotische Zellen als ROI definiert und gemittelt (Abb. 25).

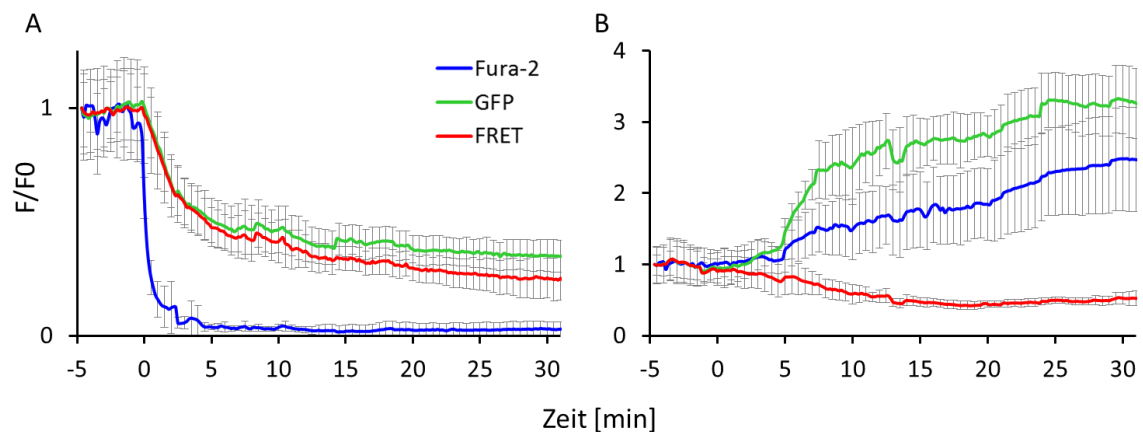


Abbildung 25: Casper3-GR zeigt spezifische Fluoreszenzveränderungen je nach Art des Zelltodes

Je 5 nekrotische und apoptotische Zielzellen wurden als ROI definiert. Die Fluoreszenzwerte wurden hintergrundbereinigt und in ihrer Intensität normiert (F/F_0). Nekrotische Zellen wurden auf den Zeitpunkt an dem die Calceinfluoreszenz auf 50% des Anfangswertes fällt normiert. Apoptosen wurden auf den Zeitpunkt normiert, an dem die GFP-Fluoreszenz erstmalig um mehr als 1% steigt. Es wurde jeweils der Durchschnitt der Fluoreszenz sowie die Standardabweichung berechnet.

(Abb. 25A) Während der Nekrose fällt die Calceinfluoreszenz durch Ausdiffusion schlagartig auf sehr niedrige Werte. Das Casper-Konstrukt diffundiert, mit verlangsamer Kinetik, ebenfalls aus den Zellen aus. Das Casper3-GR Protein besitzt ein Molekulargewicht von 54 kDa (Evrogen 2008) und hat somit ein ca. 85-fach höheres Molekulargewicht im Vergleich zu Fura-2. Trotz der verlangsamt Kinetik ist der Fluoreszenzverlust in allen Kanälen eindeutig unterscheidbar vom Fluoreszenzverhalten bei Apoptosen. (Abb. 25B) Bei Apoptosen wird das Konstrukt geschnitten und anstelle eines generellen Fluoreszenzverlustes in allen Kanälen kommt es zur Intensivierung der GFP-Fluoreszenz sowie Abfall der FRET-Fluoreszenz. Das Casper3-GR Konstrukt ermöglicht neben der spezifischen Detektion von Apoptosen somit ebenfalls die eindeutige Identifikation von Nekrosen.

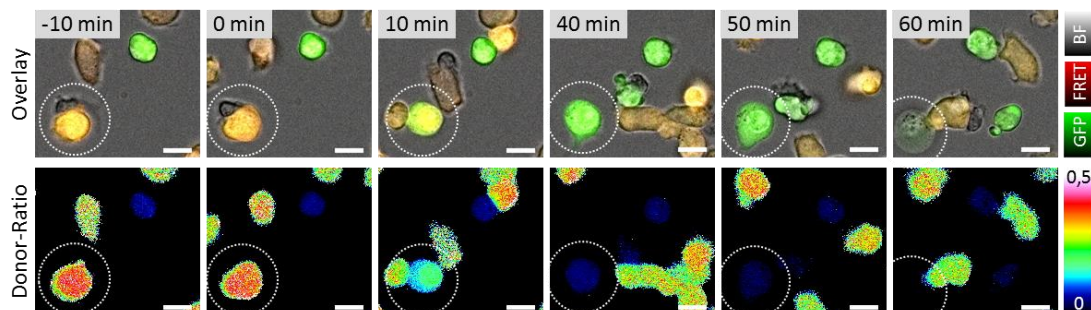
Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass während der Nekrose eine NK-Zell induzierte Membrandisruption stattfindet, durch welche zytosolische Farbstoffe aus- und Farbstoffe von außen in die nekrotischen Zellen eindiffundieren können. Diese Membrandisruption befindet sich im Bereich der IS. Der Apoptosesensor Casper3-GR zeigt charakteristische Fluoreszenzänderungen, je nach Vorliegen einer Apoptose oder Nekrose. Er kann zur Klassifizierung beider Zelltodarten genutzt werden.

5.8 Morphologie und Fluoreszenzverhalten der Zellen bei Apoptosen und Nekrosen

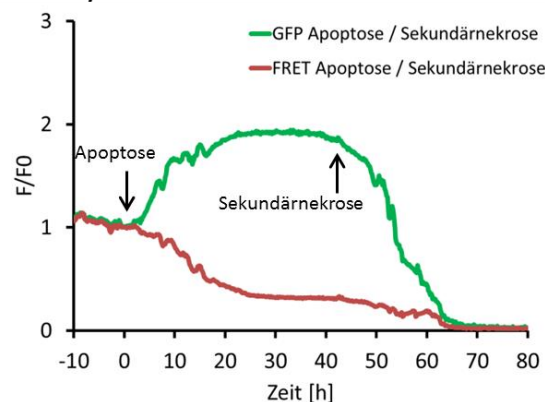
Die Bandbreite des Zielzelltodes reicht von der apoptotischen Selbstverdauung durch die Caspasekaskade bis zur nekrotischen Lyse durch Membranzerstörung. Zur Charakterisierung dieser Zelltodtypen werden morphologische und zellbiologische Kriterien angewandt. Die Veränderung des Fluoreszenzratios des FRET-Sensors ist ein eindeutiger Indikator für die Aktivität der Apoptosekaskade. Während eines nekrotischen Verlustes der Membranintegrität kommt es hingegen zu einem generellen Fluoreszenzverlust. In der Literatur ist nicht beschrieben, ob Apoptosen und Nekrosen nach einem schwarz/weiß System existieren, oder ob sie dynamisch ineinander übergehen können. Um dies zu überprüfen, wurden Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen mit primären NK-Zellen in Medium inkubiert und mikroskopiert (Beispiele in Abb. 26 – 28). Die Verfügbarkeit von Ca^{2+} im Medium sowie die Expression des CD95 Fas-Rezeptors auf Zielzellseite ermöglicht den NK-Zellen sowohl Nekrosen als auch Apoptosen auszulösen.

Apoptose / Sekundärnekrose

A Zeitreihe



B GFP / FRET Fluoreszenz



C Donor Ratio

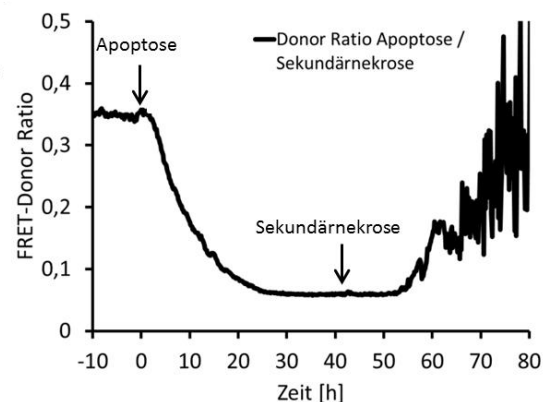


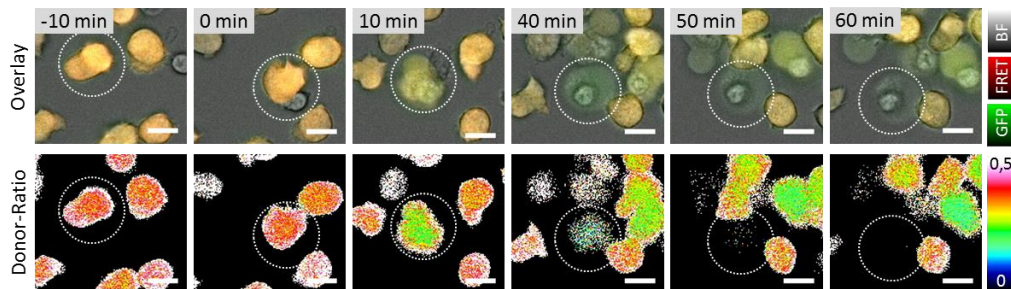
Abbildung 26: Während der Apoptose verschiebt sich das Fluoreszenzratio und erreicht Plateauwerte. An die Apoptose anschließend kann eine Sekundärnekrose folgen, die nicht durch Killerzellen induziert wird.

Jurkat E6-1 pCasper wurden mit NK-Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und mit einem Intervall von 10 s mikroskopiert. Die Abtötungsmechanismen einzelner NK-Zellen wurden kategorisiert, indem die Fluoreszenz des Casper3-GR in den Zielzellen quantifiziert wurde. (A) eine NK-Zelle überprüft durch Membrankontakt die Jurkat E6-1 pCasper Zielzelle (im Overlay orange) und bildet eine immunologische Synapse (- 10 bis 0 min). Sie initiiert die Caspasekaskade, was zum Umschlag des Casper3-GR Fluoreszenzratio führt und löst die Synapse zur Zielzelle (0 bis 10 min). Der Ratioumschlag des Apoptosesensors setzt sich autonom fort (10 bis 40 min). Anschließend verliert die Zelle ihre Membranintegrität und aufgrund der Ausdiffusion des Casper3-GR Sensors sinkt die Fluoreszenz in allen Kanälen (50 bis 60 min). Die Donor-Ratio Bilder zeigen ab dem Moment der Apoptoseinduktion bei 0 min einen graduellen Übergang auf ein niedriges Donor Ratio (0 bis 40 min). Auf die Sekundärnekrose folgend ist die Zelle innerhalb kurzer Zeit nicht mehr detektierbar (40 bis 60 min). (B) Der Signalanstieg nach der Sekundärnekrose kann durch unterschiedliche Diffusionskonstanten des geschnittenen sowie ungeschnittenen Konstrukts ausgelöst sein. Gleichzeitig nähern sich beide Fluoreszenzen dem Hintergrund an, wodurch das Donor Ratio verrauscht und nicht mehr valide ist.

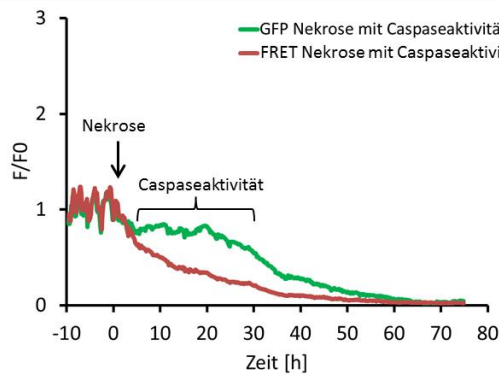
Die NK-Zelle in Abb. 26A bildet eine immunologische Synapse mit der Zielzelle, initiiert die Apoptose, löst die Synapse und verlässt die Zielzelle. In dieser wurde die Caspasekaskade initiiert, welche sich nun autonom fortsetzt und die Zielzelle proteolytisch zersetzt. Die Membranintegrität bleibt erhalten. Mit zeitlichem Abstand zur Apoptose platzt die Membran der Zielzelle ohne Kontakt zu einer NK-Zelle, was zur Ausdiffusion des Zytosols führt. Dieser Vorgang wird als apoptotische Nekrose (Majno and Joris 1995) oder sekundäre Nekrose (Vermeulen, Van Bockstaele, and Berneman 2005; Wyllie, Kerr, and Currie 1980) bezeichnet. Abb. 26B zeigt den Fluoreszenzverlauf. Während der Apoptose steigt das GFP-Signal durch Unquenching an, die FRET-Fluoreszenz sinkt. Beide Fluoreszenzveränderungen erreichen nach 20 min ein Plateau. Nach 40 min wird die Zelle sekundärnekrotisch. Sowohl die GFP- als auch FRET-Fluoreszenz sinkt schlagartig auf Hintergrundniveau ab. Das FRET-Donor Ratio in Abb. 26C ist vor der Apoptose stabil (-10 bis 0 min). Nach Beginn der Caspasekaskade fällt das Ratio auf einen Plateauwert unter 0,1 (0 bis 40 min). Während der Sekundärnekrose steigt das Donor Ratio an, das Signal wird zunehmend verrauschter (50 bis 80 min).

Nekrose mit Caspaseaktivität

A Zeitreihe



B GFP / FRET Fluoreszenz



C Donor Ratio

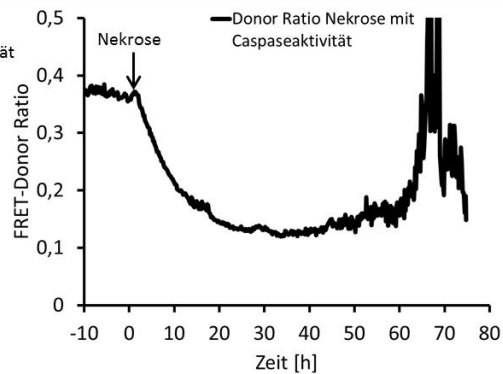


Abbildung 27: Während der Nekrose kann es zu einer Caspaseaktivität kommen, die im ausdiffundierenden Zytosol den FRET-Sensor schneidet und das Ratio verändert.

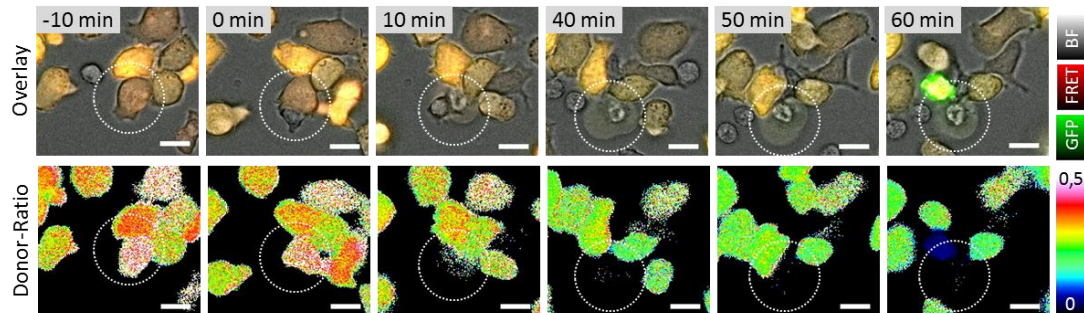
(A) 10 min vor dem Kontakt mit der Killerzelle ist die Zielzelle vital. Nach Kontakt mit der NK-Zelle wird die Zielzelle nekrotisch, das Zytosol inklusive dem Caspasesensor diffundiert aus und das Fluoreszenzsignal in allen Kanälen fällt schlagartig (10 min). Während der Ausdiffusion des Zytosols verändert sich das Fluoreszenzratio, im sich verdünnenden Zytosol wird die Caspasekaskade aktiviert (10 bis 60 min). Die Donor Ratio Bilder zeigen, dass die Zelle zunächst ein stabiles Ratio besitzt (-10 bis 0 min). Nach dem Beginn der Nekrose fällt es ab (10 min). Da sich die Fluoreszenzen durch die Verdünnung des Zytosols dem Hintergrund annähern verrauscht das Ratio zunehmend (10 bis 60 min).

Die NK Zelle in [Abb. 27A](#) bildet ebenfalls eine immunologische Synapse mit der Zielzelle, tötet diese durch Nekrose und löst den Kontakt. Während der Nekrose der Zielzelle werden Caspasen aktiviert. Ihre Aktivität wird durch die gleichzeitige Ausdiffusion des Zytosols begrenzt. In dieser Mischform erliegt die Zielzelle einem Zelltod sowohl über nekrosebedingte Ausdiffusion des Zytosols als durch Caspaseaktivität. [Abb. 27B](#) zeigt, dass das GFP-Signal zunächst nur gering unter den Ausgangswert sinkt (0 bis 30 min). Grund hierfür ist die Kombination des Fluoreszenzverlustes durch Diffusion bei gleichzeitiger Fluoreszenzintensivierung durch Unquenching. Im weiteren Verlauf überwiegt die Diffusion, das GFP-Signal fällt auf Hintergrundniveau ab (30 bis 60 min). Das FRET-Signal fällt während der Nekrose kontinuierlich (0 bis 60 min). Das Donor-Ratio in [Abb. 27C](#) der Zielzelle ist vor der Nekrose stabil (-10 bis 0 min) und fällt während der Nekro-

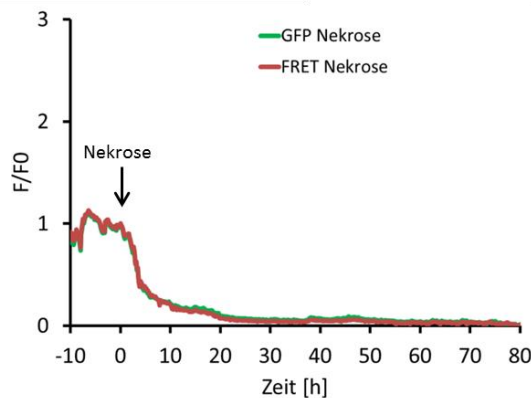
se durch die parallel aktivierte Caspasekaskade ab (0 bis 40 min). Im weiteren Verlauf verblasst es zunehmend, bedingt durch die Ausdiffusion des geschnittenen und ungeschnittenen Sensors.

Nekrose

A Zeitreihe



B GFP / FRET Fluoreszenz



C Donor Ratio

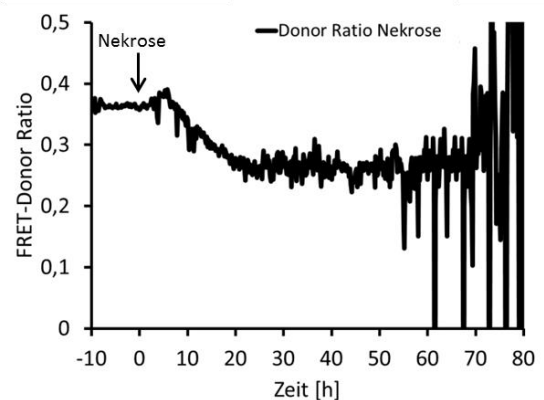


Abbildung 28: Während der Nekrose ohne Caspaseaktivität sinkt die Fluoreszenz in allen Kanälen gleichmäßig

(A) Vor dem Kontakt mit der NK-Zelle ist die Zielzelle vital mit einem stabilen Donor-Ratio (-10 bis 0 min). Die NK-Zelle bildet eine immunologische Synapse (0 min) und verursacht die Zerstörung der Zielzellmembran, was zur Nekrose der Zielzelle führt (10 min). Die Intensitäten aller Fluoreszenzsignale fallen durch Ausdiffusion des Sensors schlagartig ab, wodurch die Zelle in der Donor-Ratio Zeitreihe von einem hohen Ratio auf einen nicht mehr berechenbaren Zustand wechselt, da die Fluoreszenzsignale zu nah am Hintergrund sind (0 bis 10 min).

Die NK Zelle in Abb. 28A tötet die Zielzelle ebenfalls durch Nekrose. Im Unterschied zur Zielzelle der Abb. 27 werden im diffundierenden Zytosol keine Caspasen aktiv, das Overlay färbt sich nicht grün. Abb. 28B zeigt, dass während der Nekrose die Fluoreszenzwerte beider Kanäle schlagartig abfallen (0 bis 10 min). Die Fluoreszenzen fallen parallel, eine Aktivierung der Caspasekaskade ist nicht detektierbar. In Abb. 28C fällt unmittelbar nach der Nekroseinduktion das Ratio zunächst minimal (0 bis 20 min),

bleibt anschließend über den gesamten Verlauf stabil (20 bis 60 min). Im weiteren Zeitverlauf verrauscht es zunehmend.

Die Beispiele zeigen, dass es einen fließenden Übergang zwischen den stark unterschiedlichen Zelltodformen der Apoptose und Nekrose gibt. Zur eindeutigen Fluoreszenzquantifizierung wurden mehrere Zellen gemittelt (Abb. 29 und 30).

Apoptosen

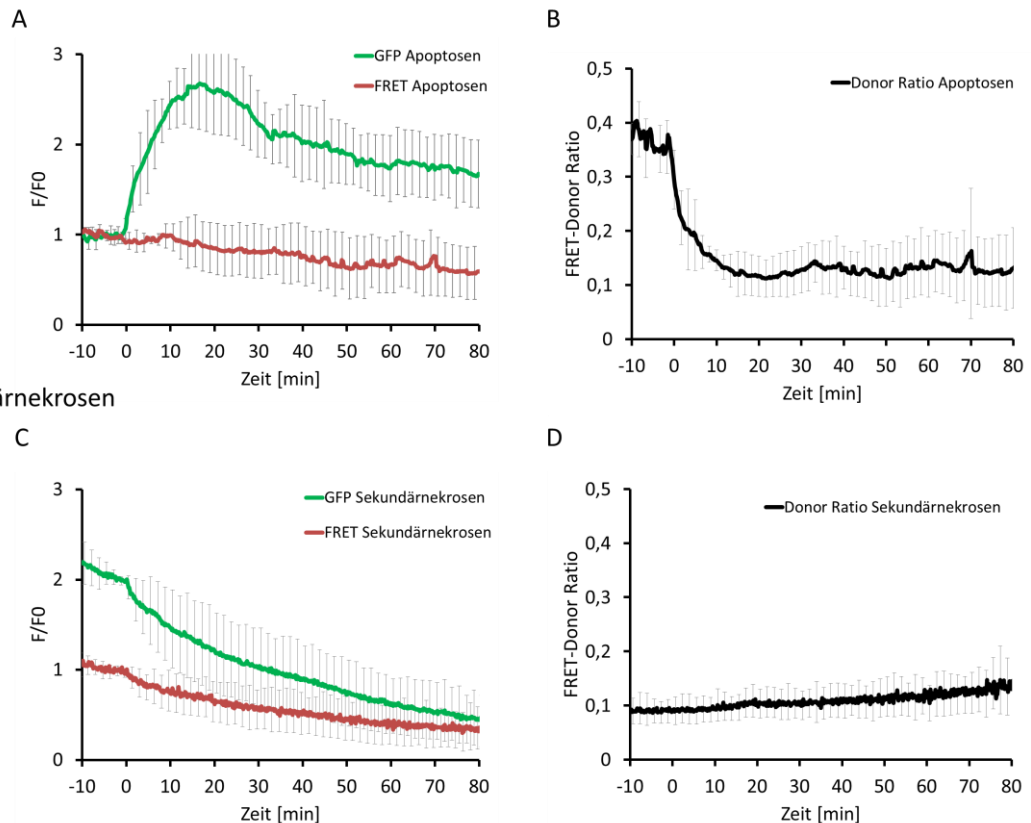


Abbildung 29: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzsignale während Apoptosen und Sekundärnekrosen

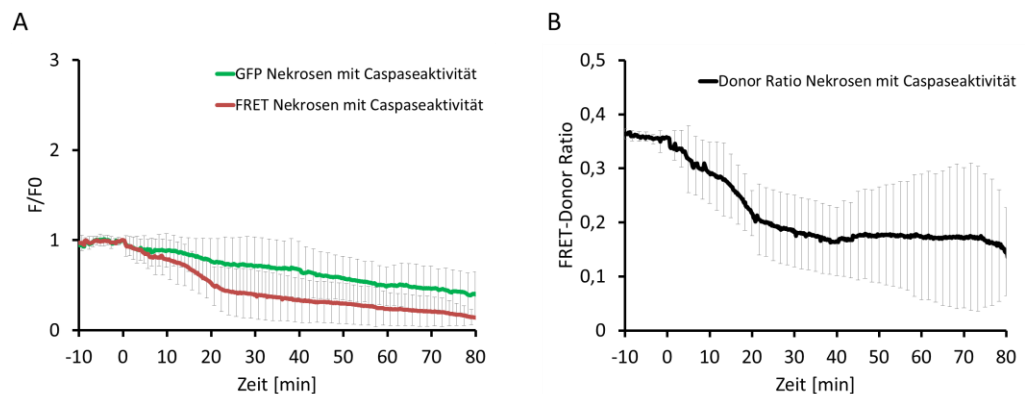
Jurkat E6-1 pCasper wurden mit NK-Zellen inkubiert. Die Fluoreszenzwerte von acht durch NK-Zellen ausgelösten Apoptosen wurden quantifiziert und zeitlich auf den Anstieg des GFP-Signales normiert ($t = 0$ min). Die Werte wurden F/F_0 normiert und Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Die Fluoreszenzintensitäten zum Zeitpunkt der Sekundärnekrose wurden im GFP-Kanal auf zwei, im FRET-Kanal auf eins normiert.

Apoptose (Abb. 29A, 29B): Durch Unquenching steigt die GFP-Fluoreszenz während der Apoptose innerhalb von 20 min auf die zwei- bis dreifache Intensität an. Dadurch sinkt das Donor Ratio von ca. 0,4 auf ca. 0,1. Nach ca. 20 min werden keine weiteren Casper3-GR Moleküle gespalten, die GFP-Intensivierung hat ihren Maximalwert erreicht

und das aufnahmebedingte, lineare Bleichen setzt ein. Sowohl die GFP- als auch die FRET-Fluoreszenz sinkt linear, das Donor Ratio verändert sich nicht.

Sekundärnekrose (Abb. 29C, 29D): Durch das Aufplatzen der Membran während der Sekundärnekrose kommt es zum plötzlichen Ausstrom des Sensors. Die Fluoreszenz fällt in beiden Kanälen exponentiell ab. Das Ratio steigt an, da geschnittene Casper3-GR Moleküle schneller ausdiffundieren als ungeschnittene.

Nekrosen mit Caspaseaktivität



Nekrosen

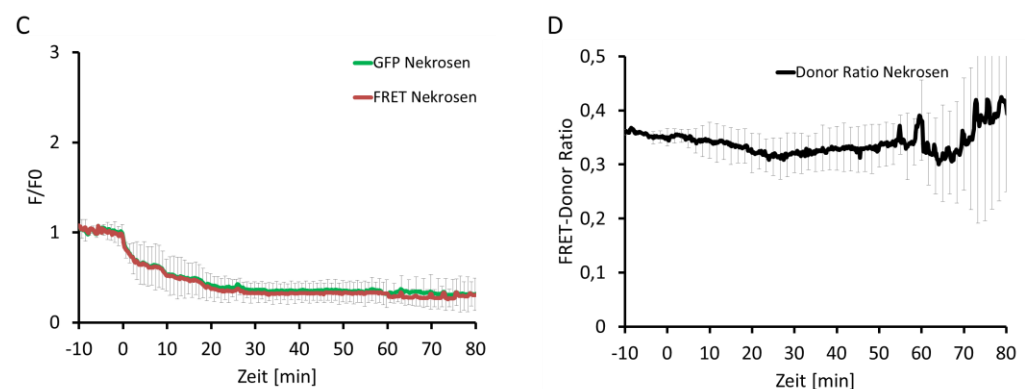


Abbildung 30: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzsignale während Nekrosen mit und ohne Caspaseaktivität

Je sechs Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen, bei denen eine Nekrose mit bzw. ohne Caspaseaktivität stattfand, wurden auf den Zeitpunkt des FRET-Fluoreszenzverlustes angeglichen ($t = 0$ min) und F/F_0 normiert.

Nekrose mit Caspaseaktivität (Abb. 30A, 30B): Während der Nekrose mit Caspaseaktivität kommt es zu einem Ausstrom des Zytosols, während gleichzeitig Caspasen in dem sich stetig verdünnenden Zytosol aktiviert werden. Durch die zusätzliche proteolytische Spaltung des Sensors während der Diffusion verschiebt sich das Fluoreszenzratio. Trotz Unquenching steigt das GFP-Signal nicht über den Ausgangswert, da die parallel

stattfindende Verdünnung des Zytosols der Signalintensivierung entgegenwirkt. Nach 20 min stoppt die Caspaseaktivität und beide Fluoreszenzwerte fallen linear. Durch die Caspaseaktivität fällt das Donor Ratio auf einen Wert nahe 0,2. Aufgrund der gleichzeitigen Verdünnung des Zytosols fällt das Donor Ratio langsamer im Vergleich zur Apoptose.

Nekrose ohne Caspaseaktivität (Abb. 30C, 30D): Unmittelbar nach der Nekrose fallen die Fluoreszenzwerte schlagartig ab. GFP- und FRET-Fluoreszenz fallen parallel. Eine Verschiebung des Ratios findet nicht statt.

Mit dem FRET-Sensor Casper3-GR ist es somit möglich Apoptosen, Nekrosen und fließende Übergänge beider Zelltodarten eindeutig zu charakterisieren. Die Existenz der Nekrose mit Caspaseaktivität weist darauf hin, dass NK-Zellen während des Abtötungsvorganges sowohl apoptose- als auch nekroseinduzierende Signalwege initiieren.

5.9 Verhalten beim Abtöten mehrerer Zielzellen

NK-Zellen töten nicht nur eine, sondern sind in der Lage mehrere Zielzellen abzutöten. Hierbei können NK-Zellen entweder von Ziel- zu Zielzelle migrieren oder gleichzeitigen Kontakt zu mehreren Zielzellen haben. Im Experiment kann man dies beeinflussen, indem die Zelldichten der NK- und Zielzellen verändert werden. Werden sie so gewählt, dass die NK-Zellen zwischen den Zielzellen migrieren müssen, so ist relativ sichergestellt, dass sie diese ausschließlich sequenziell, also in Reihe abtöten. Es ist jedoch bisher nicht endgültig geklärt wie NK-Zellen das Abtöten koordinieren, wenn sie gleichzeitigen Membrankontakt zu mehreren Zielzellen haben.

Sowohl ein paralleles als auch ein sequenzielles Modell ist denkbar. Im sequenziellen Modell wandert die Gesamtheit zytotoxischer Vesikel, koordiniert durch das mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC), gemeinsam von IS zu IS und löst den Zielzelltod (Apoptose durch Granzym B oder Nekrose durch Perforin) durch Exozytose einer bislang unbekannten Anzahl Vesikel aus. Die Induktion von Apoptosen durch CD178 könnte analog reguliert sein. Hier wäre denkbar, dass die Liganden in räumlicher Nähe zur IS akkumulieren und an der dort gebundenen Zielzelle die Apoptose auslösen. Im parallelen Modell werden die Liganden und / oder die zytotoxischen Vesikel dispers in der Zelle verteilt, so dass sämtliche, mit der Killerzelle im Membrankontakt stehenden Zielzellen gleichzeitig abgetötet werden können.

Um zu untersuchen, ob ein paralleles Abtöten von Zielzellen möglich ist, wurde die Dichte der Zellen so gewählt, dass eine NK-Zelle Kontakt zu mehreren Zielzellen haben kann ohne zwischen diesen migrieren zu müssen. Als Zielzellen werden durchgängig Jurkat E6-1 pCasper eingesetzt, deren Fas-Expression den NK-Zellen sowohl das vesikel- als auch Fas-basierte Abtöten der Zielzellen ermöglicht. Weiterhin wurde der Farbstoff LysoTracker® genutzt, der alle sauren Vesikel und somit ebenfalls die zytotoxischen anfärbt (Krzewski et al. 2013). In Vorversuchen mit LysoTracker-gefärbten und -ungefärbten NK zeigten, dass die Zytotoxizität der Vesikel nicht beeinträchtigt wird. Um die Beobachtung der Vesikel in der Zelle zu vereinfachen, wurden NK92-Zellen eingesetzt, da diese im Vergleich zu primären NK-Zellen, einen wesentlich größeren Zellkörper haben (> 10µm Durchmesser nach Adhärenz).

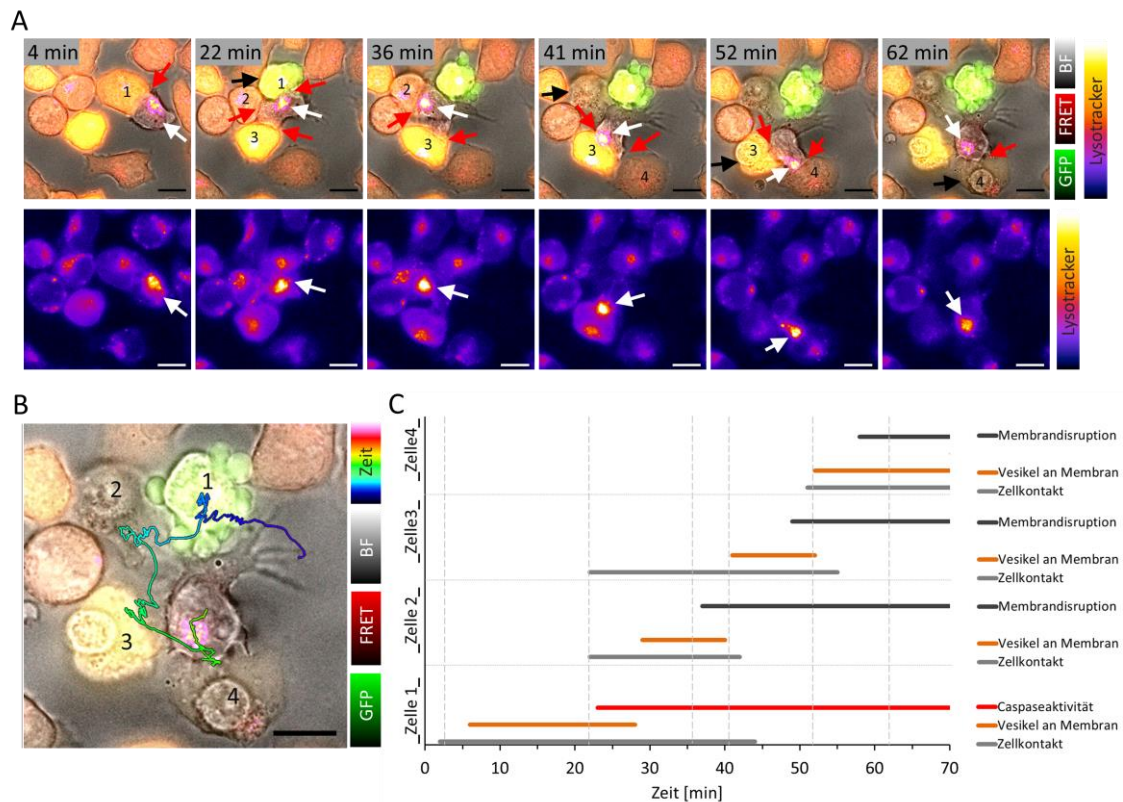


Abbildung 31: NK92 lösen vesikelabhängige Zielzelltode sequenziell aus

NK92 wurden mit LysoTracker Red geladen, gemeinsam mit Jurkat E6-1 pCasper auf einem fibronectingecoateten Coverslip inkubiert und in einer Fokalebene mikroskopiert. Um dem Bleichen des LysoTrackers entgegenzuwirken, befindet sich dieser ebenfalls im Überstand. Sowohl Killer- als auch Zielzellen nehmen ihn während der Messung auf, wodurch die Vesikel der Zielzellen ebenfalls sichtbar sind. Alle Maßstabsbalken sind 10 μm . (A) Casper3-GR-Fluoreszenz und LysoTrackerfluoreszenz werden als Overlay bzw. nur LysoTracker-fire-LUT dargestellt. (B) Die kumulativ translozierten Vesikel der NK92 wurden getrackt und in das Overlay der Minute 62 eingezeichnet. Da die Zielzellen nicht migrieren, ist ihre Position repräsentativ für das gesamte Experiment. (C) Der Kontakt zwischen NK92 und Zielzelle, Anwesenheit der Vesikel an der Membran der Kontaktstelle, sowie Caspaseaktivität und Membrandisruption der Zielzelle wurde visuell bestimmt und als Graph dargestellt

(Abb. 31A, 4min) Die NK92 adhärirt und migriert zur ersten Zielzelle. Nach Membrankontakt (roter Pfeil) translozieren die Vesikel kumulativ zur Kontaktstelle und verbleiben dort (weißer Pfeil). (Abb. 31A, 22min) In der ersten Zielzelle schlägt das Casper3-GR Ratio um, die Caspasekaskade wurde aktiviert (schwarzer Pfeil). Die NK92 migriert weiter und hat gleichzeitigen Membrankontakt zu den Zielzellen 1, 2 und 3 (rote Pfeile). (Abb. 31A, 36 min) Die immunologische Synapse zur apoptotischen Zielzelle 1 wird gelöst, der Membrankontakt zu den Zielzellen 2 und 3 wird intensiviert (rote Pfeile). Die Vesikel translozieren kumulativ zur zweiten Zielzelle und teilen sich dabei nicht auf (weißer Pfeil). An der Kontaktstelle zur Zielzelle 3 sind keine Vesikel detektierbar. (Abb.

31A, 41 min) Zielzelle 2 stirbt durch Nekrose (schwarzer Pfeil), die NK92 löst daraufhin den Membrankontakt. Die Vesikel translozieren kumulativ zur Zielzelle 3. (Abb. 31A, 52 min) Während Kontakt zur Zielzelle 3 besteht, bildet sich ebenfalls ein Kontakt zur Zielzelle 4 (rote Pfeile). Die Vesikel der NK92 verbleiben an der Zielzelle 3, bis diese nekrotisch wird (schwarzer Pfeil). (Abb. 31A, 62 min) Erst nach dem Tod der Zielzelle 3 wandern die Vesikel kumulativ zur Zielzelle 4 (weißer Pfeil), welche ebenfalls durch Nekrose stirbt (schwarzer Pfeil).

(Abb. 31B) Die Vesikel wandern sequenziell zu jeder Zielzelle und verbleiben dort, bis der Zielzelltod eingetreten ist. Anschließend wandern sie zur nächsten Zielzelle, zu der bereits Membrankontakt besteht. (Abb. 31C) Die Zeitpunkte der korrespondierenden Bilder wurden durch vertikale Striche markiert. Obwohl die NK92 mehrfach Kontakt zu mehreren Zielzellen hat (graue Linien bei 22 min, 36 min, 41 min, 52 min) befindet sich die Vesikelgruppe stets nur an einer Zielzelle (orangene Linie).

Das Experiment in Abb. 31 zeigt exemplarisch, dass die zytotoxischen Vesikel der NK92 gemeinsam translozieren. Die Zielzellen wurden ausschließlich nach dem Eintreffen der Vesikelgruppe apoptotisch (Zelle 1) oder nekrotisch (Zelle 2-4). Vesikel, die sich voneinander unabhängig bewegen und bei gleichzeitigem Kontakt zu mehreren Zielzellen auf die Kontaktstellen aufgeteilt wurden, wurden in diesem und anderen Experimenten nicht beobachtet (n = 10). Die Vesikel verbleiben an einer Kontaktstelle, bis die dortige Zielzelle abgetötet wurde. Erst danach wandern sie zur nächsten Kontaktstelle. Tötet eine NK92 über vesikelvermittelte Signalwege, geschieht dies also sequenziell.

Der Tod der ersten Zielzelle könnte sowohl durch Fas-Liganden als auch vesikelvermitteltes Granzym B ausgelöst worden sein. Fraglich ist, ob Fas-Liganden analog den Vesikeln ausschließlich an der IS akkumulieren, oder sich unabhängig der IS verteilen können. Wäre dies der Fall, könnten sie parallel zur den Vesikeln an der IS agieren. Abb. 32 zeigt exemplarisch das Abtöten von 3 Zielzellen, wobei sich die Vesikel stets bei der oberen Zielzelle befinden und zu keinem Zeitpunkt zur rechten oder unteren Zielzelle bewegen.

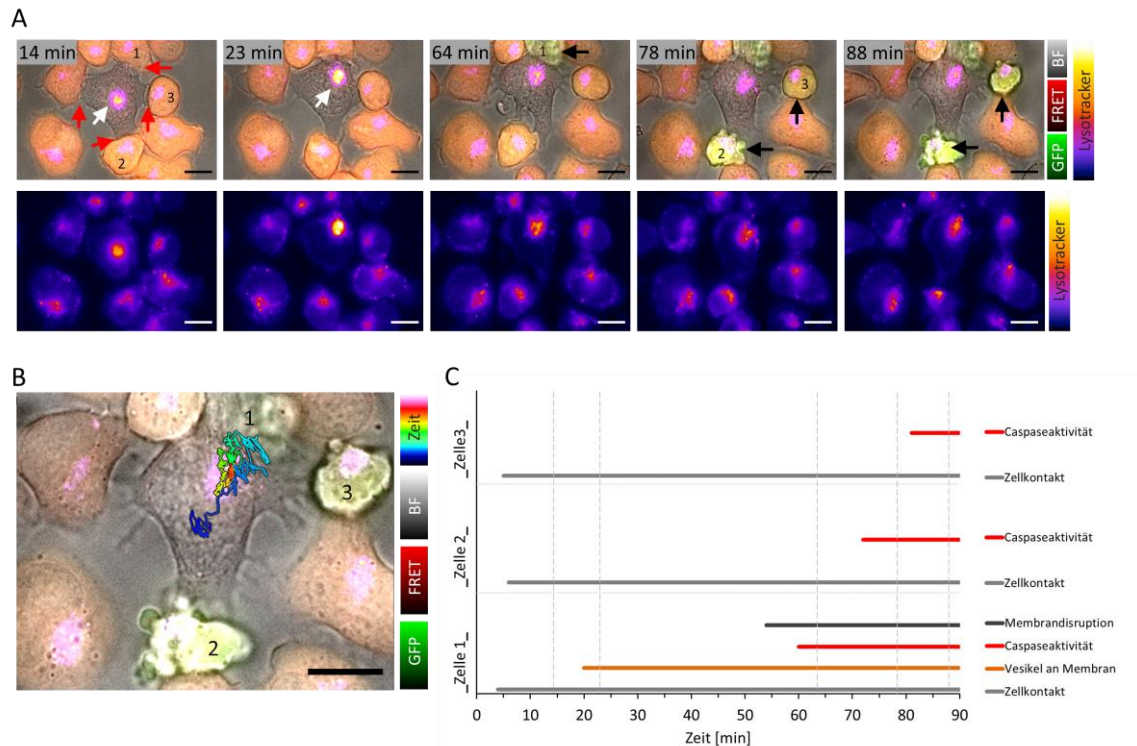


Abbildung 32: NK92 lösen Apoptosen durch Rezeptorbindung parallel zum sequenziellen Killing durch Vesikel aus

(A) Wie im vorherigen Beispiel wurden NK92 mit LysoTracker® geladen, gemeinsam mit Jurkat E6-1 pCasper auf einem fibronectingecoateten Coverslip inkubiert und in einer Fokalebene mikroskopiert. (B) Die Bewegung der Vesikel wurde getrackt und in das 88 min Overlay eingezeichnet. (C) Zellkontakte, Aufenthalt der Vesikel an der Membran, Caspaseaktivität und Membrandisruption wurden visuell bestimmt. Alle Maßstabsbalken sind 10 µm.

(Abb. 32A, 14min) Die NK92 adhärirt und hat gleichzeitigen Membrankontakt zu vier Zielzellen (rote Pfeile). Die Vesikel sind, mit annähernd gleichem Abstand zu allen Zielzellen, als Gruppe mittig in der Zelle lokalisiert (weißer Pfeil). (Abb. 32A, 23min) Die Vesikelgruppe wandert zur Zielzelle 1 (weißer Pfeil), der Membrankontakt zu den übrigen Zellen bleibt bestehen (rote Pfeile). (Abb. 32A, 64min) Zielzelle 1 wird nekrotisch (schwarzer Pfeil). (Abb. 32A, 78 und 88min) Obwohl die Vesikel sich zu keinem Zeitpunkt in der Nähe der Zielzelle 2 oder 3 befunden haben, werden diese apoptotisch (78 und 88 min). (Abb. 32B) Die Vesikel bewegen sich gemeinsam zur Zielzelle 1, befinden sich nie in der Nähe der Zielzellen 2 und 3. (Abb. 32C) Die NK92 hat durchgehend Kontakt zu den drei Zielzellen (graue Linien). Die Vesikel bewegen sich zur ersten Zielzelle und bleiben dort durchgehend (orange Linie). Zielzelle 1 stirbt durch vesikelvermittelte Nekrose (schwarze Linie). Zelle 2 und 3 sterben durch Apoptose (rote Linien).

der Zellen 2 und 3). Da die Vesikel durchgehend an der Synapse zur Zielzelle 1 lokalisiert waren, wurden diese durch Rezeptorbindung ausgelöst.

NK92 können, unabhängig von der Lokalisation der Vesikel, Apoptosen durch Rezeptorbindung auslösen. Die rezeptorvermittelte Induktion von Apoptosen läuft somit parallel zum seriellen, vesikelvermittelten Killing.

Vesikelbasiertes Abtöten durch Perforin und Granzym kann nur seriell erfolgen. Die Vesikel bewegen sich gemeinsam als Gruppe von IS zu IS und töten die Zielzellen sequenziell. Die Verteilung des Fas-Liganden CD178 unterliegt dieser Beschränkung nicht. Er kann sich unabhängig der IS in der Zelle verteilen und an den Fas-Rezeptor CD95 der Zielzellen koppeln. Das Fas-basierte Auslösen von Apoptosen kann demnach parallel zur vesikelbasierten Zytotoxizität stattfinden.

Diese Aussage ist jedoch nur dann gültig, wenn alle zytotoxischen Vesikel mit hinreichender Sicherheit detektiert wurden. Die monofokale Aufnahme der Zelle ist hierbei problematisch, da sich Vesikel (Durchmesser $< 0,5 \mu\text{m}$) ober- und unterhalb der Fokalebene befinden und somit der Detektion entgehen könnten.

Um dies zu vermeiden wurden primäre NK-Zellen eingesetzt. Da diese ein geringeres Zellvolumen im Vergleich zu NK92 haben, ist es mit hinreichend guter Zeitauflösung möglich z-Stapel aufzunehmen und somit alle Vesikel zu detektieren. Es wurde ein 63 x Ölobjectiv genutzt, die z-Schrittweite betrug 350 nm. Die Aufnahmezeit für einen z-Stapel betrug 3,5 s. Die übrigen Kanäle wurden mit wesentlich größerem Intervall (GFP / FRET = 1 min, Brightfield = 5 min) monofokal aufgenommen. Auf den Einsatz des Autofokus wurde aus Geschwindigkeitsgründen verzichtet. Während der Aufnahme wurde manuell kontrolliert, dass die NK-Zelle sich innerhalb des aufgenommenen Volumens befindet. Um die Bewegungsgeschwindigkeit der Vesikel zu verringern, wurden die Aufnahmen bei 20 °C durchgeführt. Zur Analyse wurde der LysoTracker-Kanal als Maximum Intensity Projection (MIP) zusammengefasst. Abb. 33 und 34 zeigen zwei Beispiele, bei denen sich die in 3D aufgenommenen Vesikel sequenziell von Zielzelle zu Zielzelle bewegen und diese nacheinander durch Nekrose abtöten.

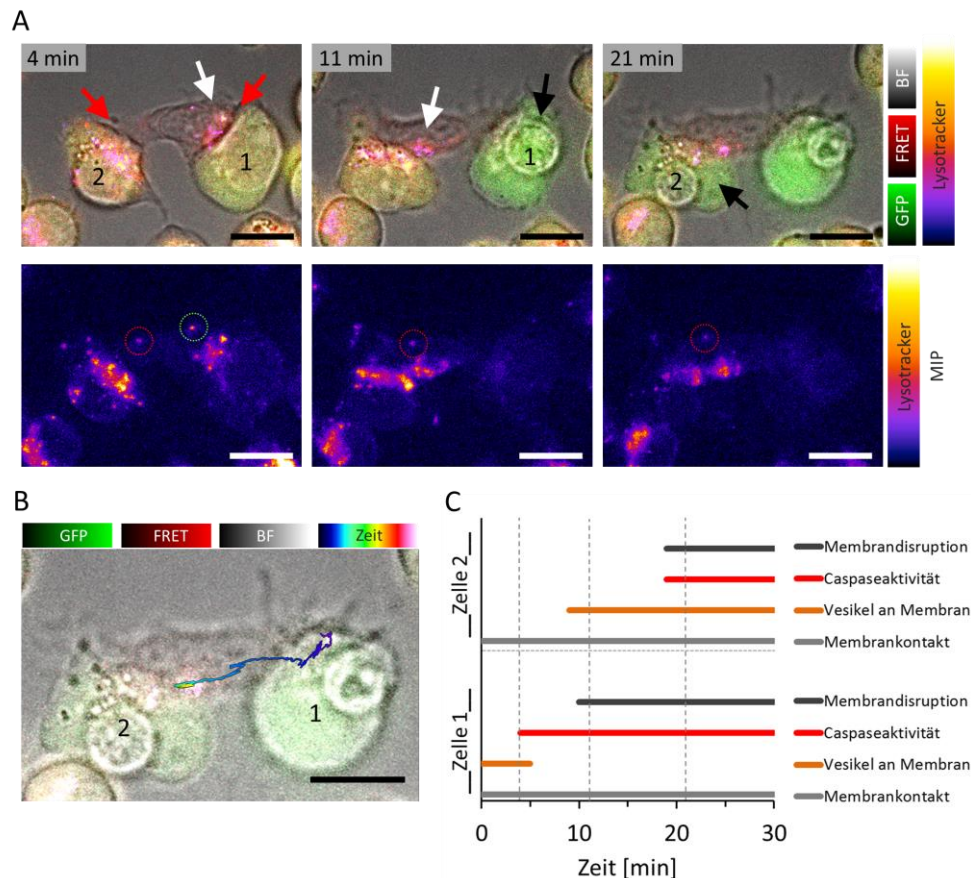


Abbildung 33: Bei primären NK ist das vesikelbasierte Abtöten von Zielzellen sequenziell (Bsp. 1)
 (A) Jurkat E6-1 pCasper und NK-Zellen wurden auf einem fibronectingecoateten Coverslip mikroskopiert. Die Vesikel wurden in 3D aufgenommen, anschließend wurde eine 2D Maximum Intensity Projection (MIP) berechnet und per fire-LUT dargestellt. Die Vesikel werden als eigener Kanal sowie als Overlay mit den Casper3-GR-Fluoreszenzen dargestellt. (B) Die Bewegung der Vesikelgruppe wurde in 3D getrackt, der Track als 2D MIP dargestellt und mit dem 21 min Casper3-GR Overlay dargestellt. (C) Zellkontakte, Vesikellokalisation, Caspaseaktivität und Membranzerstörung wurde visuell bestimmt und als Graph dargestellt.

(Abb. 33A 4 min) Die NK-Zelle hat gleichzeitigen Kontakt zu zwei Zielzellen (rote Pfeile). Die Vesikelgruppe befindet sich an der Membran zur Zielzelle 1 (weißer Pfeil). Die fire-LUT des LysoTracker-Kanals zeigt zwei einzelne Vesikel, die sich unabhängig von der Gruppe bewegen (gestrichelte Kreise). (Abb. 33A 11 min) Zielzelle 1 stirbt durch Nekrose (schwarzer Pfeil), die Gruppe wandert zur zweiten Zielzelle (weißer Pfeil). Der von der Gruppe unabhängige Vesikel nahe der Zielzelle 2 (roter Kreis) verändert seine Position nicht. Der Vesikel in der Nähe der Gruppe (grüner Kreis) wird in diese integriert. (Abb. 33A 21 min) Zielzelle 2 wird nekrotisch (schwarzer Pfeil). Der gruppenunabhängige Vesikel hat seine Position nicht verändert. (Abb. 33B) Das Tracking der Vesikel zeigt die Translokation von Zielzelle 1 zu Zielzelle 2. (Abb. 33C) Die NK-Zelle hat über den gesamten Zeitraum hinweg konstant Kontakt zu beiden Zielzellen (graue Linie). Die

Vesikelgruppe befindet sich bei Zielzelle 1, woraufhin diese nekrotisch wird (schwarze Linie). Die Vesikel wandern zur Zielzelle 2 (orangene Linie). Erst nach der Positionsveränderung der Vesikelgruppe wird die Zielzelle 2 ebenfalls nekrotisch (schwarze Linie).

Abb. 34 zeigt exemplarisch ein weiteres Beispiel vesikelbasierten, sequenziellen Abtötens.

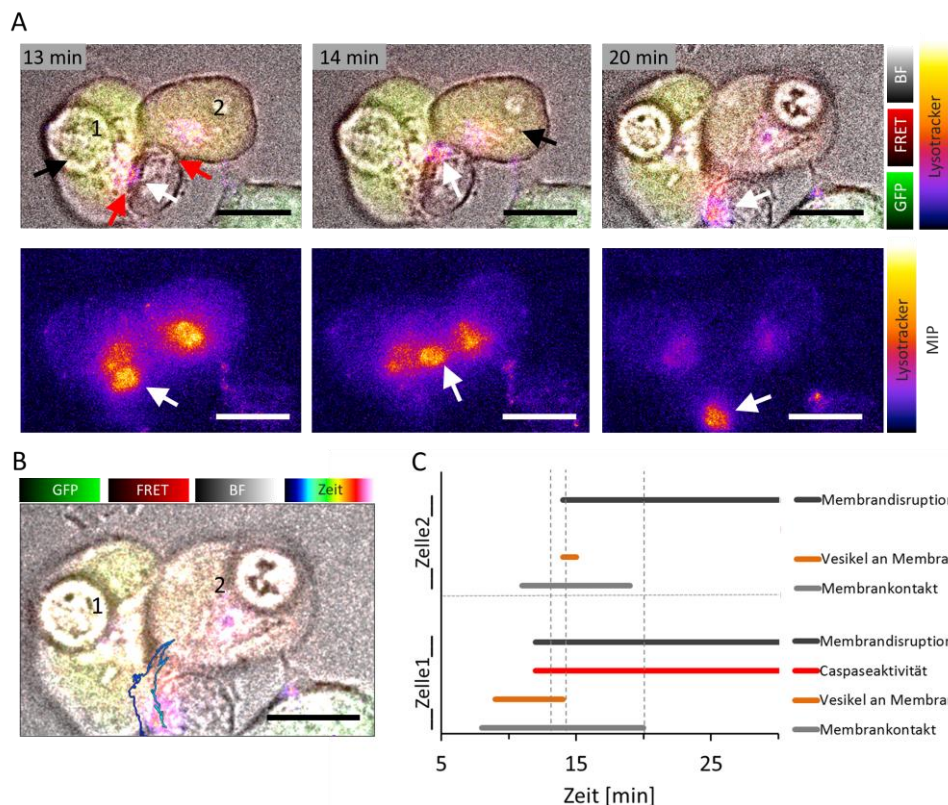


Abbildung 34: Bei primären NK ist das vesikelbasierte Abtöten von Zielzellen sequenziell (Bsp. 2) (A - C) Versuchsdurchführung und Darstellung ist analog der Abb. 33.

(Abb. 34A 13 min) Die NK-Zelle migriert zu den Zielzellen und hat gleichzeitigen Membrankontakt zu beiden (rote Pfeile). Die Vesikel wandern zur ersten Zielzelle (weißer Pfeil), worauf diese durch Nekrose stirbt (schwarzer Pfeil). (Abb. 34A 14 min) Nach dem Tod der ersten Zielzelle bewegt sich die Vesikelgruppe zur zweiten Zielzelle (weißer Pfeil), die unmittelbar auf die Ankunft der Vesikel an der Membran ebenfalls nekrotisch wird (schwarzer Pfeil). Es wurden keine Vesikel detektiert, die sich unabhängig von der Gruppe bewegen. (Abb. 34A 20 min) Nach der Nekrose der zweiten Zielzelle löst die NK-Zelle den Kontakt, die Vesikelgruppe relokalisiert in das Zentrum der NK-Zelle (weißer Pfeil) (Abb. 34B) Der Track zeigt, wie die Vesikelgruppe sequenziell zu

beiden Zielzellen migriert. (Abb. 34C) Die NK-Zelle hat gleichzeitigen Membrankontakt mit beiden Zielzellen (graue Linie). Die Vesikel wandern zunächst zur Zielzelle 1, woraufhin diese nekrotisch wird. Anschließend wandern sie zur zweiten Zielzelle, die nach dem Eintreffen der Vesikel ebenfalls platzt (orangene und schwarze Linien).

Die Beispiele zeigen, dass das vesikelbasierte Abtöten von Zielzellen bei primären NK-Zellen ebenfalls sequenziell abläuft. Die angepassten Aufnahmebedingungen erlauben das Überwachen des gesamten Zellvolumens im LysoTracker-Kanal. Es existieren vereinzelte Vesikel, die sich unabhängig der Gruppe bewegen. Die Exozytose dieser Vesikel wurde nicht beobachtet. Es hat sich, analog zu den NK92, bestätigt, dass die Nekrose der Zielzellen stets nach dem Eintreffen der Vesikelgruppe eintritt. Nach Ausschöpfen des maximalen zeitlichen und räumlichen Auflösungsvermögens des Mikroskops kann mit hinreichender Sicherheit gesagt werden, dass wenn autonome, von der Gruppe unabhängige Vesikel existieren, diese detektiert worden wären. Dies belegt, dass vesikelbasiertes Abtöten durch NK-Zellen ausschließlich sequenziell erfolgt.

Offen ist, ob primäre NK-Zellen neben dem sequenziellen, vesikelbasierten Abtöten die Zielzellen ebenfalls durch Rezeptorkopplung parallel abtöten. Abb. 35 zeigt eine NK-Zelle, die Kontakt zu drei Zielzellen hat. Obwohl die Vesikel sich ausschließlich bei Zielzelle 1 und 3 aufhalten, stirbt Zielzelle 2 durch Apoptose.

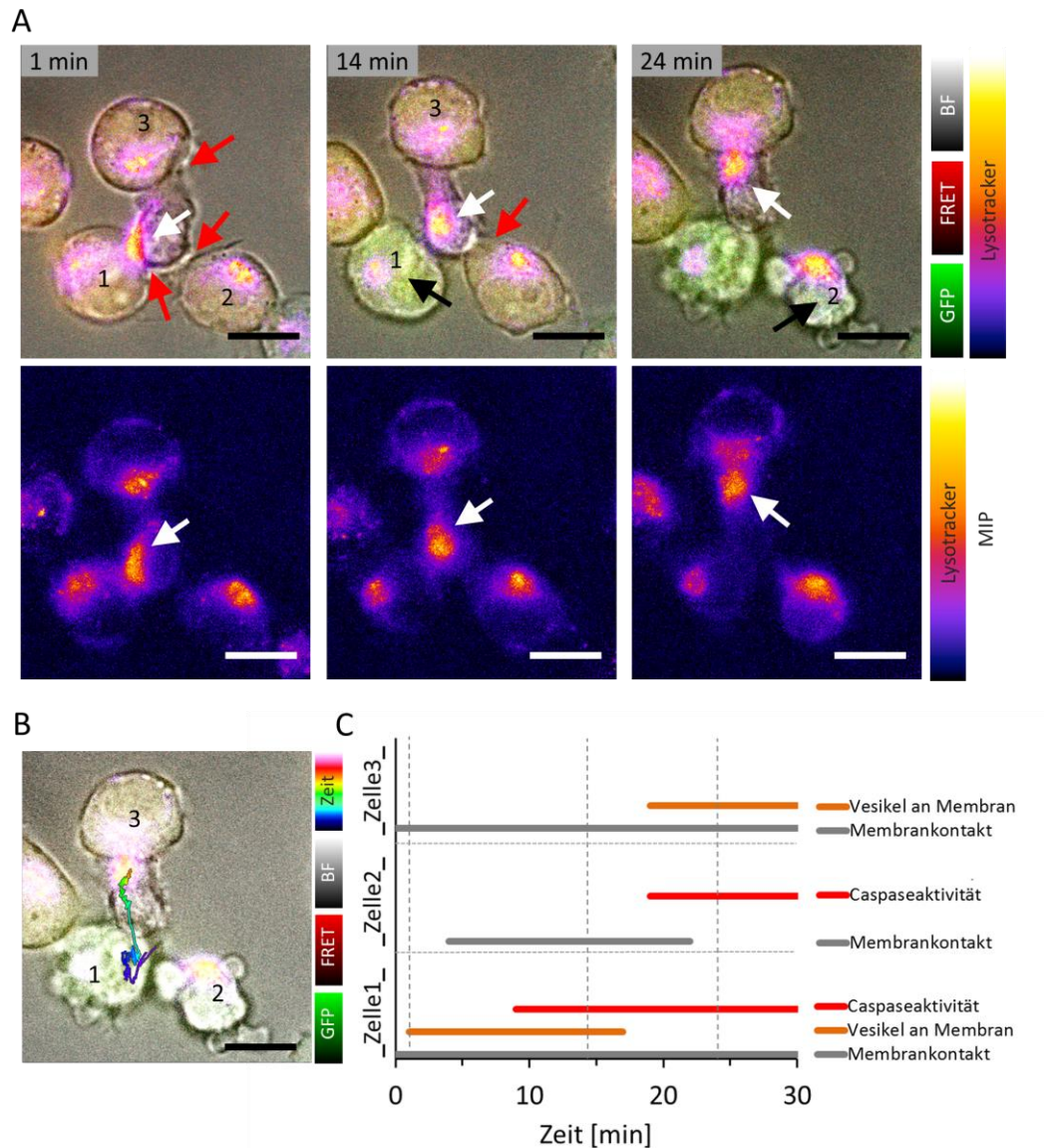


Abbildung 35: Durch Rezeptorkopplung können primäre NK-Zellen die Zielzellen parallel abtöten (Bsp. 1)

(A - C) Versuchsdurchführung und Darstellung ist analog der Abb. 33.

(Abb. 35A 1 min) Die NK-Zelle hat gleichzeitigen Membrankontakt zu den Zielzellen 1 und 3 (rote Pfeile). Die Vesikel der NK-Zelle wandern zur Zielzelle 1 (weißer Pfeil). (Abb. 35A 14 min) Die Vesikel bleiben an Zielzelle 1, bis diese apoptotisch wird (weißer Pfeil). Gleichzeitig etabliert die NK-Zelle den Membrankontakt zur Zielzelle 2, sodass sie mit allen Zellen in Kontakt ist (roter Pfeil). (Abb. 35A 24 min) Die Vesikelgruppe wandert zur Zielzelle 3 (weißer Pfeil). Die Vesikel befanden sich zu keinem Zeitpunkt an der Kontaktstelle zu Zielzelle 2, dennoch stirbt diese durch Apoptose (schwarzer Pfeil), welche demnach durch Rezeptorkopplung ausgelöst wurde. (Abb. 35B) Der Track der Vesikelgruppe zeigt, dass sich diese zur Zielzelle 1 und anschließend zur Zielzelle 3 be-

weg haben. (Abb. 35C) Ab Minute 4 hat die NK-Zelle gleichzeitigen Membrankontakt zu den drei Zielzellen (graue Linie). Die Vesikel sind zunächst an der Zielzelle 1, bewegen sich dann zur Zielzelle 3 (orangene Linie). Zielzelle 2 wird apoptotisch, ohne dass die Vesikel an der Kontaktstelle waren (rote Linie).

Abb. 36 zeigt exemplarisch ein weiteres Beispiel einer parallel induzierten Apoptose.

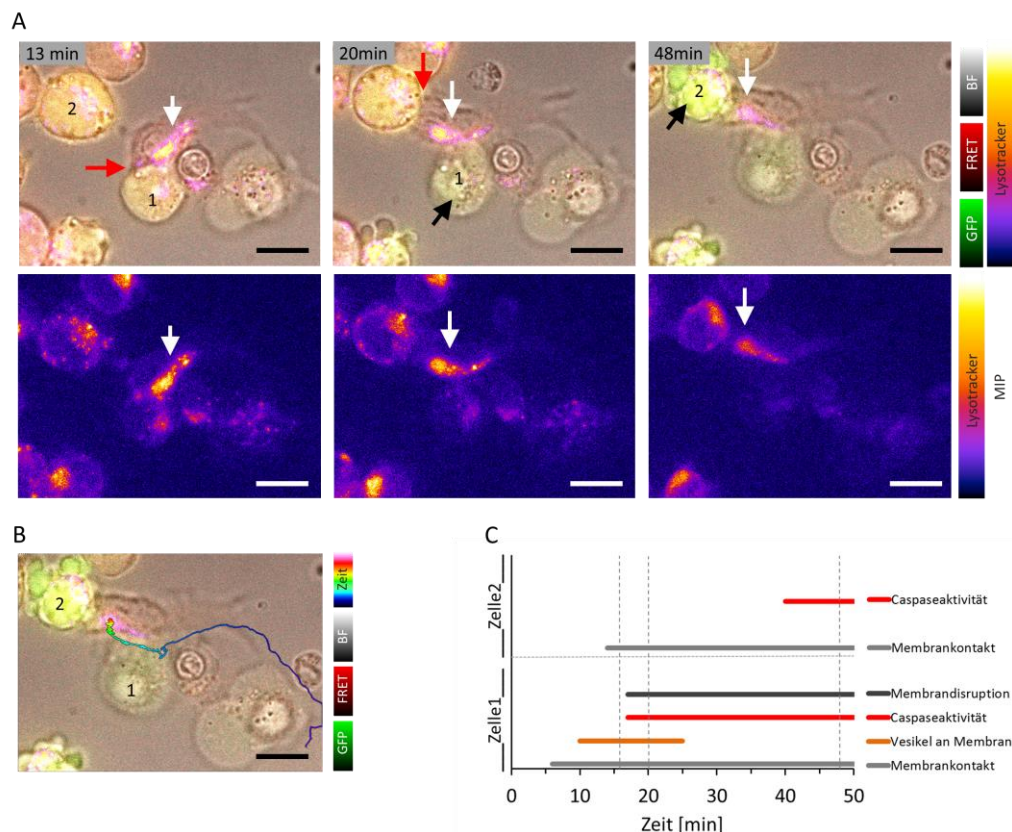


Abbildung 36: Durch Rezeptorkopplung können primäre NK-Zellen die Zielzellen parallel abtöten (Bsp. 2)

(A - C) Versuchsdurchführung und Darstellung ist analog der Abb. 33.

(Abb. 36A 13 min) Die NK-Zelle migriert zur Zielzelle 1 und etabliert eine immunologische Synapse (roter Pfeil). Die Vesikel bewegen sich ebenfalls zur Kontaktstelle (13 min). Noch bevor die Zielzelle 1 stirbt, etabliert die NK-Zelle einen Membrankontakt zur Zielzelle 2. (Abb. 36A 20 min) Die Vesikelgruppe bleibt an der Kontaktstelle zu Zielzelle 1, die durch Nekrose stirbt (schwarzer Pfeil). (Abb. 36A 48 min) Die Vesikelgruppe verlässt die IS zur Zielzelle 1, wandert jedoch nicht bis zur IS der Zielzelle 2, sondern bleibt zentral in der Zelle (weißer Pfeil). Es kann kein Vesikel detektiert werden, dass die IS zur Zielzelle 2 erreicht. Obwohl die Vesikel sich nicht an der Membran zur Zielzelle 2 befinden, stirbt sie durch Apoptose (schwarzer Pfeil). (Abb. 36B) Der

Endpunkt des Tracks der Vesikelgruppe liegt zwischen beiden Zielzellen. (Abb. 36C) Nach Eintreffen der Vesikelgruppe stirbt die Zielzelle 1 durch Nekrose (orangene und schwarze Linie). Zielzelle 2 stirbt durch Apoptose, obwohl die Vesikel die Membran nicht erreicht haben.

Die Beispiele in Abb. 35 und 36 zeigen, dass auch primäre NK-Zellen durch Rezeptorkopplung den Tod von Zielzellen unabhängig von den Vesikeln und somit parallel zum seriellen Vesikelkilling auslösen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die zytotoxischen Vesikel innerhalb der Killerzelle als Gruppe wandern. Dank der Aufnahme der Vesikel in 3D wurden einzelne, gruppenunabhängige Vesikel beobachtet, jedoch wurden diese entweder in die Vesikelgruppe integriert oder blieben stationär innerhalb der NK-Zelle und hatten keinen Einfluss auf deren Zytotoxizität.

Da die Vesikelgruppe gemeinschaftlich wandert und die Vesikel nicht an verschiedene Lokalisationen innerhalb der Zelle aufgeteilt werden, kann geschlussfolgert werden, dass das vesikelabhängige Töten sequenziell erfolgt.

Zielzellen können allerdings auch in Abwesenheit von Vesikeln durch Fas-vermittelte Apoptose sterben. Der rezeptorvermittelte Zielzelltod ist räumlich nicht von der Position der Vesikel abhängig und kann zeitlich parallel zu anderen Zielzelltoden ablaufen.

5.10 Untersuchung der Sequenzabfolge von Apoptose und Nekrose

Töten NK-Zellen mehrere Zielzellen, so können sie Apoptosen und Nekrosen auslösen. Es stellt sich die Frage, ob die Todesart randomisiert oder koordiniert gewählt wird.

Um dies zu untersuchen wurden life cell imaging Messungen über acht Stunden durchgeführt. Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen wurden als Monolayer auf Fibronectin adhärirt und mit NK-Zellen in einem Ratio von zehn Zielzellen zu einer NK-Zelle inkubiert.

Es wurden NK-Zellen von drei Spendern eingesetzt, mit denen jeweils fünf Messungen durchgeführt wurden. Die Messungen erfolgten innerhalb von drei Tagen, die NK-Zellen wurden nicht IL-2 stimuliert. Zur Auswertung wurden pro Messung je 10 bis 12 NK-Zellen zufällig ausgewählt und über den gesamten Messzeitraum ausgewertet. Es wurde tabellarisch festgehalten wann die beobachtete NK-Zelle Kontakt zur Zielzelle hatte, wann die Zielzelle starb, ob dies durch Apoptose, Nekrose mit oder ohne Caspaseaktivität geschah und ob und wann die NK-Zelle selbst starb. Als Viabilitätskriterium der NK-Zelle wurde hierfür die im Durchlicht sichtbare Bewegung von Zellorganellen und die Ausbildung von Filopodien genutzt.

Insgesamt wurden 176 NK-Zellen ausgewertet, diese töteten insgesamt 591 Zielzellen. Abb. 37 schlüsselt auf, wie viele Zielzellen pro NK-Zelle getötet wurden:

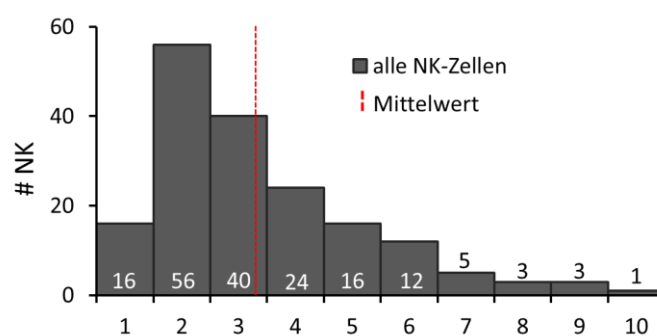


Abbildung 37: Im Schnitt tötet jede NK-Zelle 3,26 Zielzellen, die maximale Anzahl liegt bei 10 abgetöteten Zielzellen
176 NK-Zellen wurden entsprechend der von ihnen abgetöteten Zielzellen kategorisiert.

Im Schnitt töten NK-Zellen 3,26 Zielzellen, bis sie selbst sterben. Das Maximum liegt bei 10 Zielzellen. Nachfolgend werden die Zielzelltode kategorisiert:

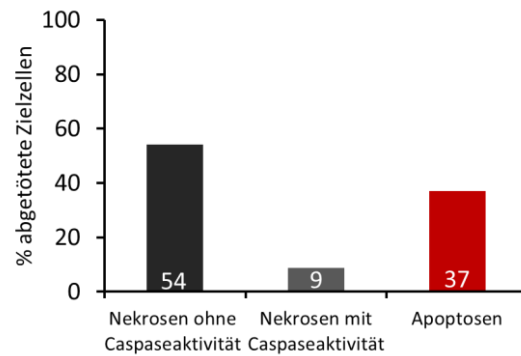


Abbildung 38: 63 % der durch NK-Zellen induzierten Zielzelltode sind Nekrosen

Alle Zielzellen wurden in die Kategorien Nekrose ohne Caspaseaktivität, Nekrose mit Caspaseaktivität und Apoptose unterteilt (n = 591). 320 Zielzellen wurden durch Nekrose abgetötet (54 %), 52 durch Nekrose mit Caspaseaktivität (9 %) und 219 durch Apoptose (37 %).

Der Vergleich der Zielzelltode in Abb. 38 zeigt, dass NK-Zellen überwiegend durch Nekroseinduktion abtöten. Ein deutlicher Unterschied zwischen Apoptosen und Nekrosen liegt in der Zeit, die vom ersten Kontakt bis zum Zielzelltod vergeht (Abb. 39).

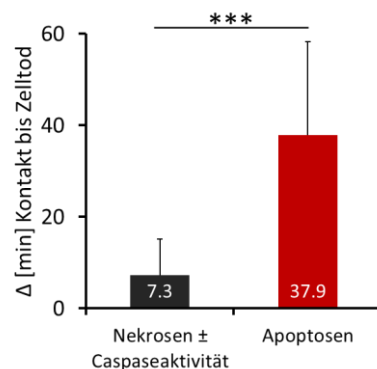


Abbildung 39: Nekrosen laufen wesentlich schneller ab als Apoptosen

Im Durchschnitt vergehen 7,3 min vom ersten Kontakt der NK-Zelle zur Zielzelle bis zu deren Nekrose. Eine Apoptose benötigt im Schnitt 37,9 min.

Abb. 39 zeigt, dass Apoptosen wesentlich zeitintensiver sind als Nekrosen. Abb. 40 zeigt die Verteilung von Apoptosen und Nekrosen pro NK-Zelle.

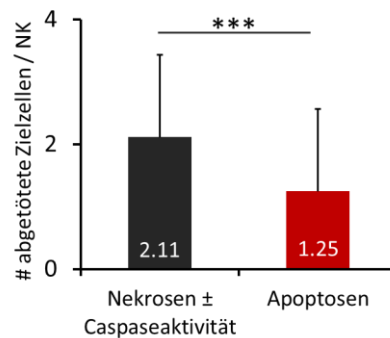


Abbildung 40: Im Schnitt tötet eine primäre, humane NK-Zelle 3,36 Zielzellen.

176 NK-Zellen töteten in den Versuchen 591 Zielzellen ab, somit 3,36 Zielzellen pro NK-Zelle. Im Schnitt wurden 2,11 Zielzellen durch Nekrose \pm Caspaseaktivität (Standardabweichung 1,32) und 1,25 durch Apoptose abgetötet (Standardabweichung 1,39).

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen induziert jede NK-Zelle im Schnitt 2,11 Nekrosen und 1,25 Apoptosen (Abb. 40).

Interessanterweise löst nicht jede NK Zelle beide Formen des Zielzelltodes aus, manche verursachen ausschließlich Apoptosen oder Nekrosen. Aus diesem Grund wurden die NK-Zellen in Abb. 41 kategorisiert, je nachdem ob sie ausschließlich Nekrosen (N), ausschließlich Apoptosen (A) oder beides auslösten. Lösten sie beides aus, wurde kategorisiert, ob zunächst Nekrosen und dann Apoptosen stattfanden ($N \rightarrow A$), oder umgekehrt ($A \rightarrow N$).

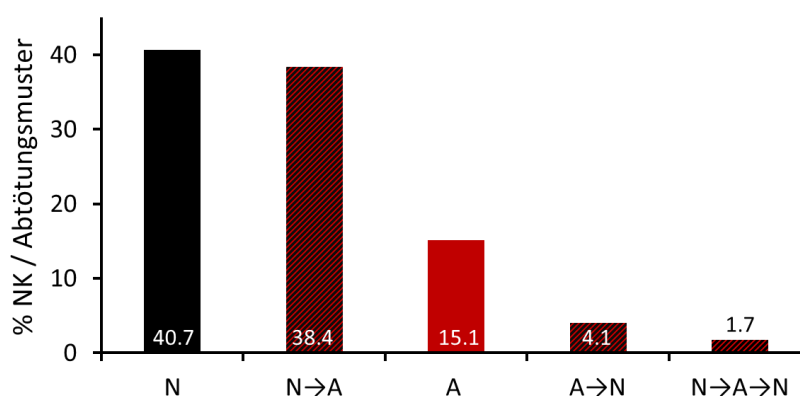


Abbildung 41: NK-Zellen bevorzugen hierarchisch Nekrosen vor Apoptosen

Aus der Gesamtheit aller untersuchten NK-Zellen ($n = 176$) töteten 40,7 % ihre Zielzellen ausschließlich durch Nekrosen ($n = 70$). 38,4 % der NK initiieren zunächst Nekrosen, gehen dann auf das Auslösen von Apoptosen über ($n = 66$). Nur 15 % der NK-Zellen lösen in ihren Zielzellen ausschließlich Apoptosen aus ($n = 26$). Der Wechsel von Apoptosen auf Nekrosen findet bei 4,1 % der NK-Zellen statt ($n = 7$). Der Übergang der Induktion von Nekrosen auf Apoptosen und ein Rückwechsel zur Nekroseinduktion wurde bei 1,7 % der NK ($n = 3$) beobachtet.

Abb. 41 zeigt, dass 40% der NK-Zellen die Zielzellen durch Nekrosen abtöten. Weitere 40% der NK-Zellen beginnen ihre Abtötungsserie mit Nekrosen, wechseln dann zur Apoptoseinduktion. NK-Zellen, die ihre Zielzellen von Anfang an durch Apoptosen abtöten, wechseln in der Regel nicht zur Induktion von Nekrosen. Um die Effizienz der NK-Zellen verschiedener Kategorien zu vergleichen, wurde berechnet, wie viele Zielzellen pro NK-Zelle in einer Stunde abtötet wurden (Abb. 42).

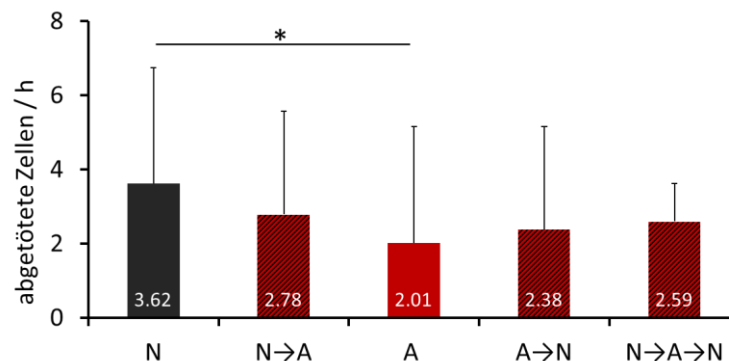


Abbildung 42: NK-Zellen, die nur Nekrosen induzieren töten pro Stunde die meisten Zielzellen

Die Killerzellen wurden entsprechend ihres Abtötungsmusters kategorisiert und die durchschnittliche Anzahl abgetöteter Zielzellen pro Stunde errechnet. NK-Zellen, die ausschließlich durch Nekroseinduktion abtöten, sind in diesem Vergleich die schnellsten NK-Zellen, da sie 3,62 Zielzellen pro Stunde abtöten. NK-Zellen, deren Abtötungsmuster von Nekrosen auf Apoptosen wechselt, töten pro Stunde 2,78 Zielzellen. NK-Zellen, die ausschließlich Apoptosen induzieren, töten pro Stunde im Schnitt 2,01 Zielzellen. Die seltenen Mischformen A→N sowie N→A→N sind mit 2,38 sowie 2,59 Zielzellen pro Stunde vergleichbar mit der häufig vorkommenden N→A Kategorie.

In Abb. 39 wurde gezeigt, dass NK-vermittelte Nekrosen schneller ablaufen als Apoptosen. Betrachtet man die Effizienz der NK-Zellen in einer Stunde, bestätigt die Analyse in Abb. 42, dass NK Zellen, die nur Nekrose nutzen, am effizientesten sind. Reine Apoptose-Killer sind am ineffizientesten. NK-Zellen, die einen Wechsel des Abtötungsmechanismus durchführen, liegen wie erwartet im Mittelfeld.

Jedoch unterscheiden sich nekrotisch oder apoptotisch abtötende NK-Zellen nicht nur in ihrer „Arbeitsgeschwindigkeit“, sondern auch in ihrer Viabilität. Abb. 43 zeigt, dass NK-Zellen, die durch Nekrose töten, eine deutlich geringere Aktivitätsdauer haben im Vergleich zu NK-Zellen, die durch Apoptosen töten.

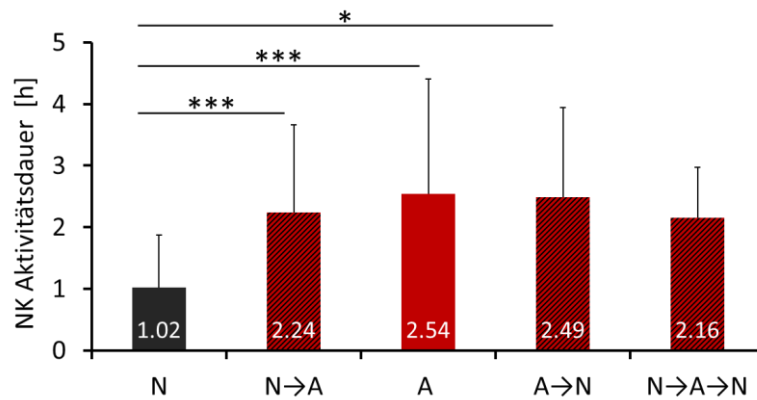


Abbildung 43: NK-Zellen verschiedener Kategorien sind unterschiedlich lange aktiv

Abb. 43 zeigt, dass NK-Zellen, die ausschließlich durch Nekroseinduktion abtöten, mit 1,02 Stunden die kürzeste durchschnittliche Lebensdauer haben. NK-Zellen die ihr Abtötungsmuster wechseln, sind mit 2,24 Stunden mehr als doppelt so lange aktiv wie NK-Zellen, die ausschließlich Nekrosen auslösen. Löst eine Zelle ausschließlich Apoptosen aus, lebt sie mit 2,54 Stunden am längsten.

Bei der Frage welche NK-Zellen die effektivsten sind, ist nicht nur die „Arbeitsgeschwindigkeit“ relevant, sondern auch die Aktivitätsdauer. Abb. 44 vergleicht die Anzahl abgetöteter Zielzellen über die gesamte Aktivitätsdauer und teilt die NK in Untergruppen auf. Nekroseinduzierende, apoptoseinduzierende und moduswechselnde NK bilden Untergruppen.

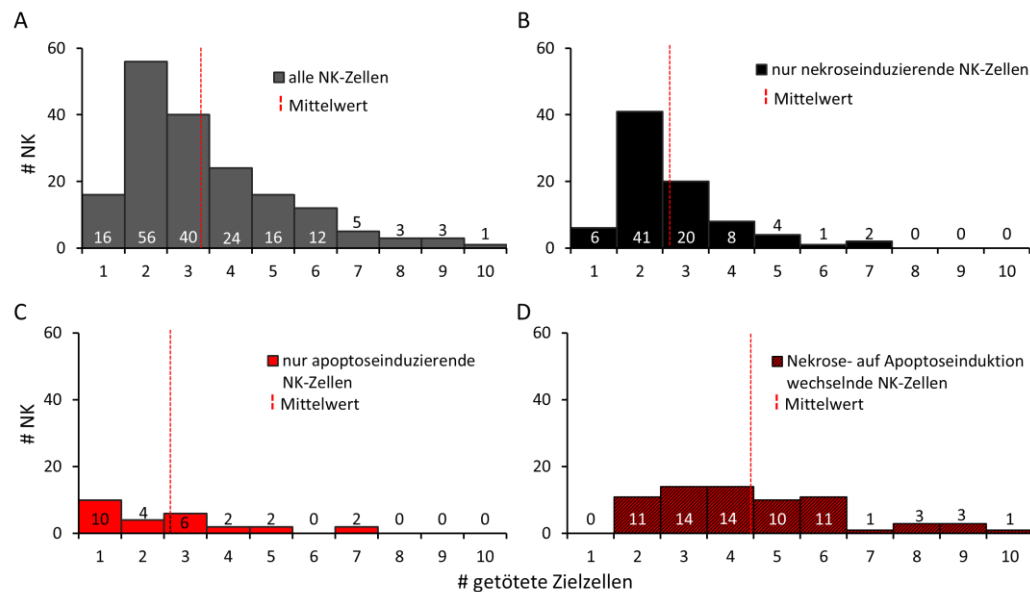


Abbildung 44: Je nach Abtötungsmuster sind NK-Zellen unterschiedlich effizient

Die Gesamtheit aller NK-Zellen tötet im Schnitt 3,26 Zielzellen unter den gewählten experimentellen Bedingungen ab (A). (B) NK-Zellen, die ausschließlich Nekrosen induzieren, töten im Schnitt 2,68 Zielzellen. (C) NK-Zellen, die ausschließlich Apoptosen induzieren, töten im Schnitt 2,62 Zielzellen. (D) NK-Zellen, die von der Nekroseinduktion auf die Apoptoseinduktion wechseln, töten im Schnitt 4,47 Zielzellen.

Abb. 44 zeigt, dass sich die Aussage über den effizientesten Abtötungsmodus verändert, wenn man die gesamte Aktivitätsdauer betrachtet. (Abb. 45A) Unter den gewählten experimentellen Bedingungen liegt der Schnitt der Gesamtpopulation bei 3,26 abgetöteten Zielzellen pro NK-Zelle. (Abb. 44B, 44C) Sowohl die reinen Nekrose-Killer als auch die reinen Apoptose-Killer sind über die Gesamtdauer der Messung gesehen mit durchschnittlich 2,68 bzw. 2,62 abgetöteten Zielzellen unter dem Durchschnitt der Gesamtpopulation. Rein nekroseauslösende NK-Zellen töten zwar sehr schnell, haben jedoch auch eine geringere Viabilität. Rein apoptoseauslösende NK-Zellen haben zwar eine hohe Viabilität, jedoch töten sie die Zielzellen nur sehr langsam. (Abb. 44D): NK-Zellen die beide Modi einsetzen, kombinieren die Vorteile beider Abtötungsmechanismen: sie töten die ersten Zielzellen nekrotisch und somit schnell, wechseln dann zur Apoptoseinduktion, erhalten dadurch ihre Viabilität und verlängern ihren Aktivitätszeitraum.

Drei beispielhafte Killingverläufe jeder Kategorie sind in Abb. 45 dargestellt.

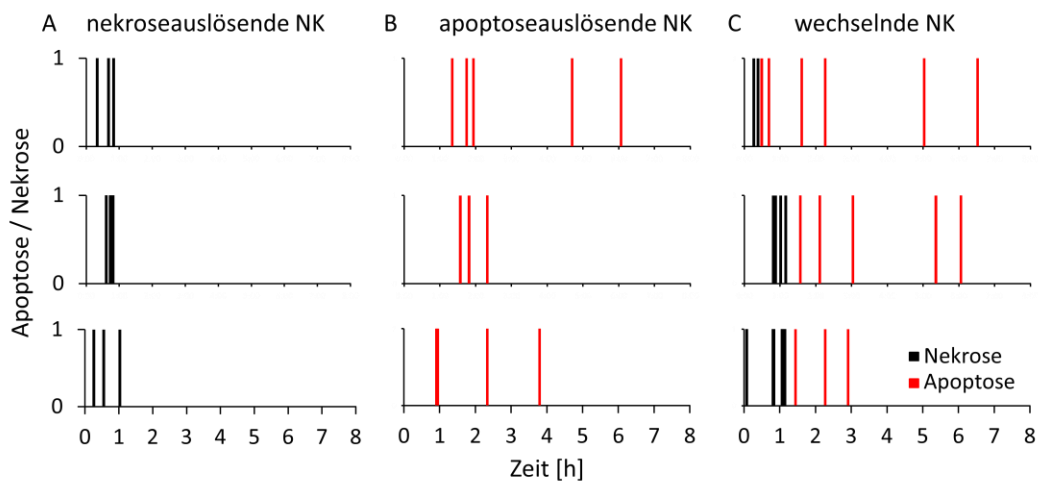


Abbildung 45: Effizienzsteigerung von NK Zellen durch den Wechsel von frühen Nekrosen zu späten Apoptosen.

Für jede NK-Zelle wurde bestimmt ob und wann sie eine Nekrose (schwarze Balken) oder Apoptose (rote Balken) verursacht. Die Zielzelltode wurden über die Zeit aufgetragen.

(Abb. 45A) Nekrosen finden zu Beginn der Messung statt und folgen schnell auf einander. (Abb. 45B) Apoptosen setzen später und mit größerem Zeitabstand zueinander ein. (Abb. 45C) Wechselt die NK den Mechanismus, zeigt sich die Hierarchie der Nekroseauslösung vor der Apoptoseauslösung. Weiterhin entsteht ein kooperativer Effekt: durch die Kombination früher und schneller Nekrosen und dem Übergang auf langsamere, aber die NK-Viabilität erhaltende Apoptosen sind die mechanismuswechselnden NK-Zellen die effektivsten (Abb. 45C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NK-Zellen Nekrosen auf regelmäßiger Basis und gegenüber Apoptosen bevorzugt auslösen. Nekrosen laufen schneller ab als Apoptosen. Beginnt eine NK-Zelle mit Nekrosen, kann sie auf die Auslösung von Apoptosen wechseln. Beginnt sie mit Apoptosen, wechselt sie in der Regel nicht zur Auslösung von Nekrosen. Moduswechselnde NK-Zellen die effektivsten.

5.11 Zytotoxische Vesikel als Nekrosemediatoren

Zytotoxische Vesikel transportieren Perforin und Granzym B, was wiederum in den Zielzellen Nekrosen bzw. Granzym B induzierte Apoptosen auslösen. Die Immunzelle bildet eine immunologische Synapse mit der Zielzelle, Vesikel wandern innerhalb der Zelle zur IS und Perforin sowie Granzym B werden exozytiert.

Das Ziel der folgenden Experimente war es, Vesikel in 3D in möglichst hoher Zeitauflösung zu erfassen, einzelne Vesikel zu tracken, Informationen über die Vesikelbewegung innerhalb der Zelle zu erhalten und im Optimalfall Exozytoseereignisse zu beobachten, die auf Zielzellseite mit dem Feedback des Apoptose / Nekrosesensors Casper3-GR korreliert werden können.

Dieses Ziel stellt extreme Anforderungen an die zeitliche sowie räumliche Auflösung der 3D-Daten, wodurch sich experimentelle Probleme ergeben, denen im Experimentdesign wie folgt begegnet wurden:

Tabelle 7: Die dreidimensionale Aufnahme schneller Prozesse in subzellulärer Auflösung stellt extreme experimentelle Anforderungen

Problem	Lösungsansatz
Nukleofektion von NK-Zellen in Vortests nicht erfolgreich	Einsatz des Farbstoffes LysoTracker Red
Farbstoff färbt ebenfalls Vesikel der Zielzelle	Ausschluss der Zielzellvesikel durch softwareseitige Bewegungsstabilisierung der NK-Zelle und Definition einer 3D-ROI, die nur die NK-Zelle beinhaltet. Manuelles Entfernen von Tracks, die nicht von NK-Zellvesikeln stammen
Farbstoff bleicht während des Experimentes	Laden und Vorrat des Farbstoffes im Überstand mit 400nM statt 50 – 75nM (Herstellerangabe) zur Verbesserung des Nachladens des Farbstoffes während des Experimentes
Diffraaktionslimit der Weitfeldmikroskopie begrenzt die Auflösung einzelner Vesikel	Dekonvolution der 3D-Daten. Nutzung einer experimentellen PSF sowie Nyquist-Sampling für optimale Dekonvolutionsqualität
Eigenbewegung der Vesikel führt zu Artefakten in der Aufnahme	Schnellstmögliches Intervall der Z-Aufnahme durch Minimierung der Exzitationszeit, minimaler Anzahl der Z-Ebenen, hardwaregetriggerte Ansteuerung des Z-Piezo, Verzicht auf Autofokus, minutenweise, monofokale Aufnahme übriger Kanäle, Aufnahme bei 22°C

Exakte Erläuterungen sind im Abschnitt Material und Methoden ausführlich beschrieben.

Abb. 46 zeigt beispielhaft die Qualitätsverbesserung der 3D-Vesikeldaten vor und nach Dekonvolution.

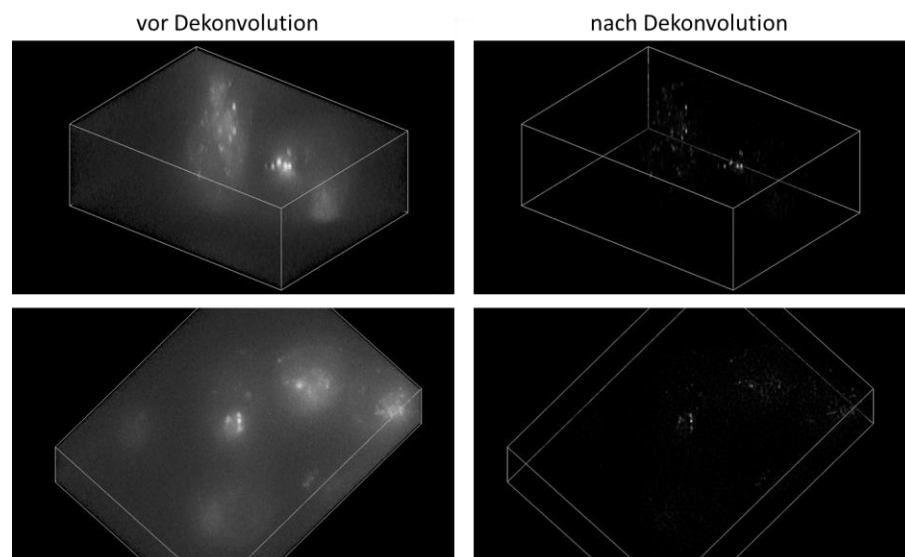


Abbildung 46: Die Dekonvolution verbessert das Signal zu Rauschverhältnis und die Auflösung
Der LysoTracker-Kanal wurde mittels experimenteller PSF mit dem Programm Huygens (SVI) dekonvoluiert. Als Abbruchkriterium wurden eine Unterschreitung der Signalverbesserung von 0,001 % oder 400 Iterationen ohne Signalverbesserung gesetzt, was die Möglichkeiten der Dekonvolution ausschöpft.

Abb. 46 zeigt, dass durch Dekonvolution der Hintergrund nahezu eliminiert und das Signal zu Rauschverhältnis (SNR) verbessert wurde. Im Zytosol entstehen intensitätsschwache, punktförmige Artefakte, da die Dekonvolution an der Obergrenze der Nachverbesserung arbeitet und der Algorithmus beginnt gleichmäßige, zytosolische Fluoreszenz zu punktförmigen Ausgangsquellen zurückzurechnen. Da sie einen mindestens 100-fachen Intensitätsunterschied zum vesikulären Signal haben, können sie im späteren Tracking über einen Schwellenwert ausgeschlossen werden. Durch die Dekonvolution können zuvor verschmolzene Vesikel getrennt wahrgenommen werden.

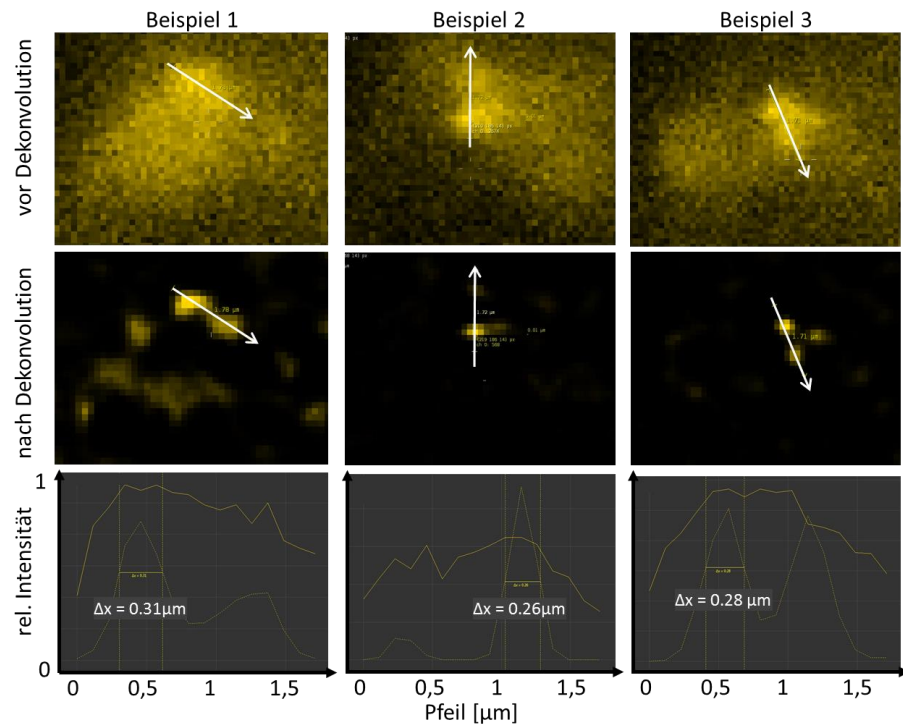


Abbildung 47: Die Dekonvolution verbessert das SNR und erhöht die Auflösung
 Einzelne Z-Ebenen wurden vor und nach Dekonvolution verglichen. Der Line-Plot vergleicht die Signalintensitäten vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Dekonvolution.

Alle Beispiele in Abb. 47 zeigen, dass das SNR deutlich verbessert wurde und Strukturen, die in den Rohdaten aufgrund in einander übergehenden Streulichtes verschmelzen, nun getrennt wahrgenommen werden können. Die Halbmaxima dekonvolvierter Vesikel sind ca. 280 nm voneinander entfernt. Abb. 48 vergleicht den xy-Durchmesser der Vesikel in den Roh- bzw. dekonvolvierten Daten.

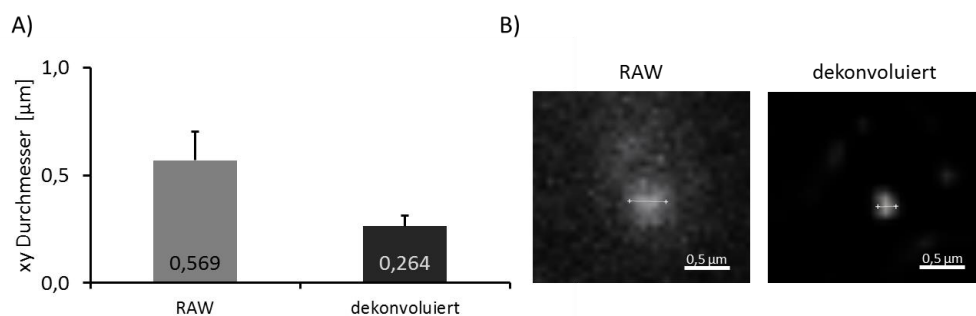


Abbildung 48: Nach Dekonvolution messen die Vesikel im xy-Durchmesser im Durchschnitt 264nm

Abb. 48A: Insgesamt 15 einzelne Vesikel aus 3 NK-Zellen wurden in ihrem xy-Durchmesser in der Fokalebene vermessen. In den Rohdaten haben die Vesikel einen

Durchmesser von 569 nm, in den dekonvoluierten Daten 263 nm. [Abb 48B](#) zeigt beispielhaft einen Vesikel in der Fokalebene vor und nach Dekonvolution.

Die Zeit- sowie Ortsauflösung wurde durch die Optimierung der Aufnahmeparameter sowie Dekonvolution der Daten verbessert. Abb. 49 zeigt beispielhaft die mit unterschiedlicher Zeitauflösung aufgenommenen, synchronisierten Kanäle. Der LysoTracker-Kanal wird als MIP dargestellt und vor sowie nach Dekonvolution gezeigt.

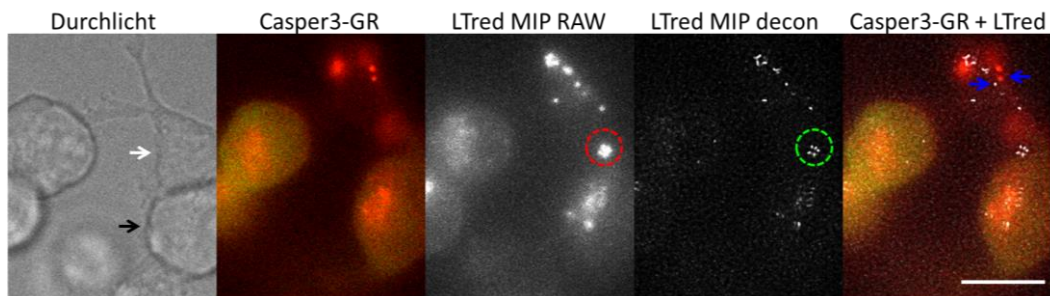


Abbildung 49: Optimierung der Aufnahmeparameter sowie Dekonvolution der Daten ermöglicht Vesikel in 3D zu beobachten und ihre Bewegung mit dem Casper3-GR Sensor zu korrelieren.

Die 2D Zeitserien des Durchlicht- und Casper3-GR-Kanals wurden mit dem LysoTracker-Kanal synchronisiert. Dieser wurde dekonvoluiert und als MIP berechnet. Der Maßstabsbalken zeigt 10 μm .

Die NK-Zelle (weißer Pfeil) bildet eine Synapse mit der Zielzelle (schwarzer Pfeil). Die Vesikel bewegen sich zur Synapse. Durch die Dekonvolution sind einzelne Vesikel getrennt erkennbar (grüner Kreis), was in den Rohdaten nicht möglich ist (roter Kreis). Durch die unterschiedliche Zeitauflösung der Kanäle (Durchlicht 5 min, Casper3-GR 1 min, LysoTracker 3 sek) entstehen im Overlay Artefakte. Die blauen Pfeile zeigen beispielhaft die mit hoher Rate abgetastete Position der Vesikel und die verzögerte Aktualisierung des Vesikels im FRET-Kanal des Casper3-GR. Das Tracking der Vesikel wurde testweise sowohl in den Rohdaten als auch dekonvoluierten 3D Zeitreihen durchgeführt. Die Vesikel wurden in den Rohdaten erkannt, jedoch brachen die Tracks im Vergleich zu den dekonvoluierten Datensätzen früher ab und wurden vermehrt fehlerhaft verknüpft. Zur Analyse wurden deswegen nur die dekonvoluierten Daten genutzt.

Neben der zeitlichen und räumlichen Auflösung ist es essentiell, die Eigenbewegung der NK-Zelle zu bestimmen und zu stabilisieren. Erst nach Stabilisation kann die Eigenbewegung der Vesikel analysiert werden. Abb. 50 zeigt beispielhaft die Stabilisierung einer NK-Zelle.

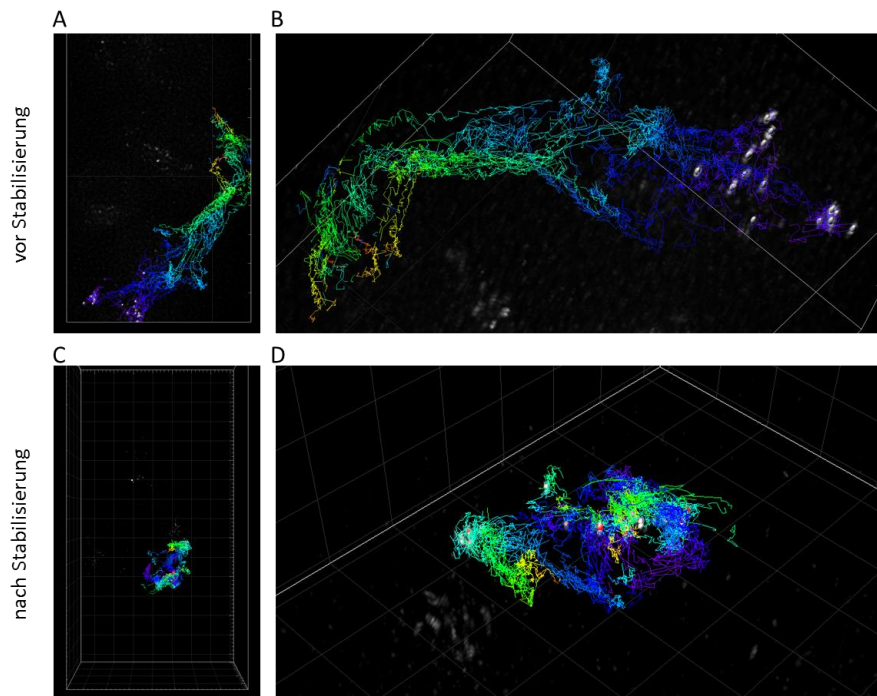


Abbildung 50: Im dekonvoluierten Datensatz können die Vesikel automatisiert erkannt und getrackt werden

Mittels Spot-Detektion wurden im dekonvoluierten Datensatz Vesikel automatisiert erkannt (Vorgabe 300 nm xy-, 600 nm z-Durchmesser). Die Spots wurden mit einem Algorithmus, der ein autoregressives Bewegungsmodell antizipiert, automatisiert zu Tracks verbunden (maximale Schrittweite 1 μm , maximale Detektionslücke 3 Zeitpunkte). Alle Tracks sind mit einer rainbow-LUT zeitkodiert. Je später der Zeitpunkt, desto langwelliger die Trackfarbe.

Abb. 50A und 50B zeigen, dass sich zur Vesikelbewegung die Eigenbewegung der NK-Zelle durch Migration hinzuaddiert. In Abb. 50C und 50D wurde die Eigenbewegung der Zelle von den Vesikeltracks abgezogen. Die Gesamtheit aller Tracks wurde genutzt, um die Eigenbewegung der Zelle zu bestimmen. Die Zelle ruht nach der Korrektur stationär im Raum.

Die stabilisierten Datensätze wurden im Detail betrachtet. Ziel war es, zum Zeitpunkt der Nekrose der Zielzelle das Ende einzelner Tracks an der IS zu beobachten, um somit die Anzahl exozytierter Vesikel zu bestimmen. Die Detailansicht zeigte jedoch, dass trotz aller Optimierungen sowohl die räumliche als auch die zeitliche Auflösung zu gering war um verlässliche Tracks zu erzeugen. Es existieren zwar Vesikel, die sich einzeln durch die Zelle bewegen, generell bewegen sich die Vesikel jedoch in Gruppen. Einzelne Vesikel können sich aus einer Gruppe lösen, jedoch auch wieder verschmelzen. Bewegen sich die Vesikel als Gruppe, ist die räumliche Auflösung zu gering und einzelne Vesikel können nicht mehr unterschieden werden. Auch ist es trotz Verringern der

Temperatur bei gleichzeitiger Optimierung des Aufnahmeintervalls nicht möglich, einander räumlich nahe, sich schnell bewegende Vesikel über mehrere Zeitpunkte hinweg eindeutig zu identifizieren. Somit konnten die automatisiert erzeugten Tracks durch manuelle Korrektur nicht weiter aufbereitet werden. Da beim Abtöten von Zielzellen die Vesikel als Gruppe zur IS wandern, konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob das Ende eines Tracks bedeutet, dass der Vesikel exozytiert wurde, oder in die Gruppe der übrigen, an der IS befindlichen Vesikel integriert wurde.

Um dennoch Informationen über die Bewegung zu gewinnen, wurden Vesikel selektiert, in deren unmittelbarer Nähe sich keine weiteren befanden. Dies vermeidet Trackingfehler durch Verwechslung.

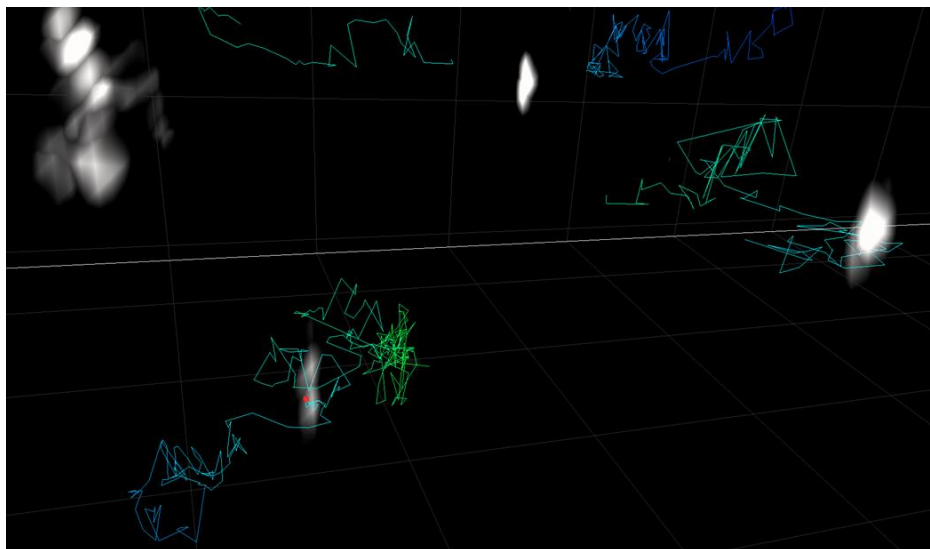


Abbildung 51: Selektion von Tracks einzelner Vesikel

Tracks einzelner Vesikel wurden ausgewählt. Der automatisierten Filterung (Mindestlänge des Tracks 30 s, Mindestintensität des Vesikels 30 % des hellsten Vesikels) wurde eine manuelle Aufbereitung angeschlossen, in der Tracks von Vesikelgruppen (bspw. oben links) ausgeschlossen wurden.

Abb. 51 zeigt zwei exemplarische Vesikeltracks, die zur statistischen Analyse genutzt werden können, da sich die Vesikel nicht in der Nähe anderer Vesikel befinden und ihr Track zweifelsfrei nachvollziehbar ist. Es wurden insgesamt 19 Tracks von drei verschiedenen NK-Zellen ausgewertet. Jede NK-Zelle migrierte während der Aufnahme zu einer Zielzelle, bildete eine IS aus und tötete die Zielzelle durch Nekrose. Die Tracks wurden sowohl vor- als auch während der ausgebildeten IS erhoben, stellen also einen Mittelwert der Bewegung einzelner Vesikel einer aktiven, zytotoxisch aktiven NK-Zelle dar. Die Eigenbewegung der NK-Zelle durch Migration wurde von den Tracks abgezo-

gen. Um die Qualität der Tracks zu gewährleisten wurden nur Vesikel getracked, die sich einzeln bewegten und ihre Fluoreszenz eine Mindestintensität nicht unterschritten. Die durchschnittliche Tracklänge betrug $21,85 \mu\text{m}$, die durchschnittliche Dauer 6:40 min. Abb. 52 zeigt die statistische Auswertung der Tracks.

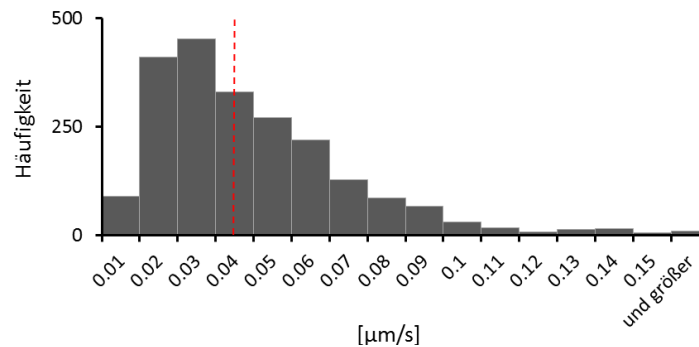


Abbildung 52: Die mittlere Vesikelgeschwindigkeit bei 22°C beträgt $0,04 \mu\text{m/s}$. 2145 Datenpunkte in einem Intervall von 3,5 s wurden aus 10 Tracks erhoben, zwischen denen die jeweilige Vesikelgeschwindigkeit bestimmt wurde.

Abb. 52 zeigt die Verteilung der Vesikelgeschwindigkeiten. Es muss beachtet werden, dass die Verteilung möglicherweise durch eine zu geringe Abtastrate verfälscht sein könnte. Bewegte sich der Vesikel zwischen den Messintervallen (3,5 s) gradlinig, ist die hier angegebene Verteilung korrekt. Tat er das nicht, war die Abtastrate zu gering und die tatsächliche Geschwindigkeit des Vesikels höher als bestimmt. Die mittlere Geschwindigkeit eines Vesikels unter den gewählten experimentellen Bedingungen beträgt $0,04 \mu\text{m/s}$.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass 3D-Zeitreihen der Vesikel mit 2D-Zeitreihen des Apoptosesensors synchronisiert und Vesikelbewegungen parallel mit dem FRET-Sensor aufgenommen werden konnten. Durch Optimierung gelang es, ein Aufnahmeintervall von 3,5 s/Z-Stack zu erreichen. Durch Dekonvolution wurde die Erkennbarkeit der Vesikel verbessert. Der mittlere Vesikeldurchmesser nach Dekonvolution wurde bestimmt. Da die Dekonvolution ein iterativer Prozess ist, der nach Erreichen subjektiver Parameter beendet wird, kann allerdings keine absolute Größenaussage für die Vesikel getroffen werden. Nach Einsatz der Dekonvolution und Abbruch des Prozesses bei ersten Anzeichen einer Artefaktbildung, ergaben die Messungen einen mittleren Durchmesser von 264 nm, was sich mit Literaturangaben deckt (Krzewski and Coligan 2012). Die Datensätze wurden für die Eigenbewegung der NK-

Zellen korrigiert. Die Detailansicht ergab, dass trotz aller Optimierungen sowohl die räumliche als auch zeitliche Auflösung zu gering war um zuverlässige Aussagen über die Korrelation der Exozytose von Vesikeln und dem dadurch ausgelösten Zielzelltod zu treffen. Um einen Datensatz mit möglichst niedrigem Trackingfehler zu erhalten, wurde die Bewegung einzelner Vesikel getracked. Unter Beachtung der Limitierung des Aufnahmeintervalls und der Annahme, dass die Vesikel sich zwischen den Messpunkten gradlinig bewegten, bewegten sich bei 22°C einzelne Vesikel innerhalb einer zytotoxischen NK-Zelle mit einer mittleren Geschwindigkeit von 0,04 $\mu\text{m/s}$ und konnten Höchstgeschwindigkeiten von $> 0,1 \mu\text{m/s}$ erreichen.

5.12 Nekrosen / Apoptosen durch aufgereinigtes Perforin / Granzym im killerzellfreien System

Durch die Exozytose zytotoxischer Vesikel setzen Killerzellen Perforin und Granzym B frei, welche in den Zielzellen Nekrosen und Apoptosen auslösen. Das in der Literatur beschriebene Modell sieht vor, dass Granzym B perforinvermittelt in die Zielzelle eindringt und durch Caspaseaktivierung Apoptosen auslöst (Ilia Voskoboinik, Whisstock, and Trapani 2015). Alternativ löst Perforin in erhöhter Konzentration Nekrosen durch Membranzerstörung aus. Das konzentrationsabhängige Zusammenspiel beider Proteine ist in der Lage sowohl Apoptosen als auch Nekrosen zu verursachen. Der in dieser Arbeit etablierte Assay zur zeitaufgelösten parallelen Analyse von Apoptose und Nekrose eignet sich hervorragend, um das Zusammenspiel von Perforin und Granzym B auf Einzelzellebene zu untersuchen und eine mögliche Dosisabhängigkeit der verschiedenen Prozesse zu testen.

Dazu wurden die Zellen mit Perforin und Granzym B inkubiert, welches aus der humanen YT-NK-Zelllinie aufgereinigt wurde. Die Aktivität des Perforin wird vom Hersteller in permeabilisierenden Einheiten (PU) angegeben. 0,1 PU permeabilisieren nach Herstellerangaben 50 % Jurkatzellen in 100 μl bei einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$, was 2 ng in 100 μl und somit 20 pg/ μl entspricht (Enzo Life Sciences 2015b). Für Granzym B wird angegeben, dass 1 ng/ μl 1×10^6 Zellen abtötet, wenn es in die Zielzellen eingebracht wird (Enzo Life Sciences 2015a). Literaturangaben zeigen, dass 200 pg/ μl 80 % des Effektes bewirken (Froelich et al. 1996).

Es wurden Perforinkonzentrationen bis 200 pg/ μ l bei einer festen Granzym B Konzentration von 200 pg/ μ l getestet (Abb. 53). In der höchsten Konzentration werden Perforin und Granzym B stöchiometrisch 1:1 eingesetzt.

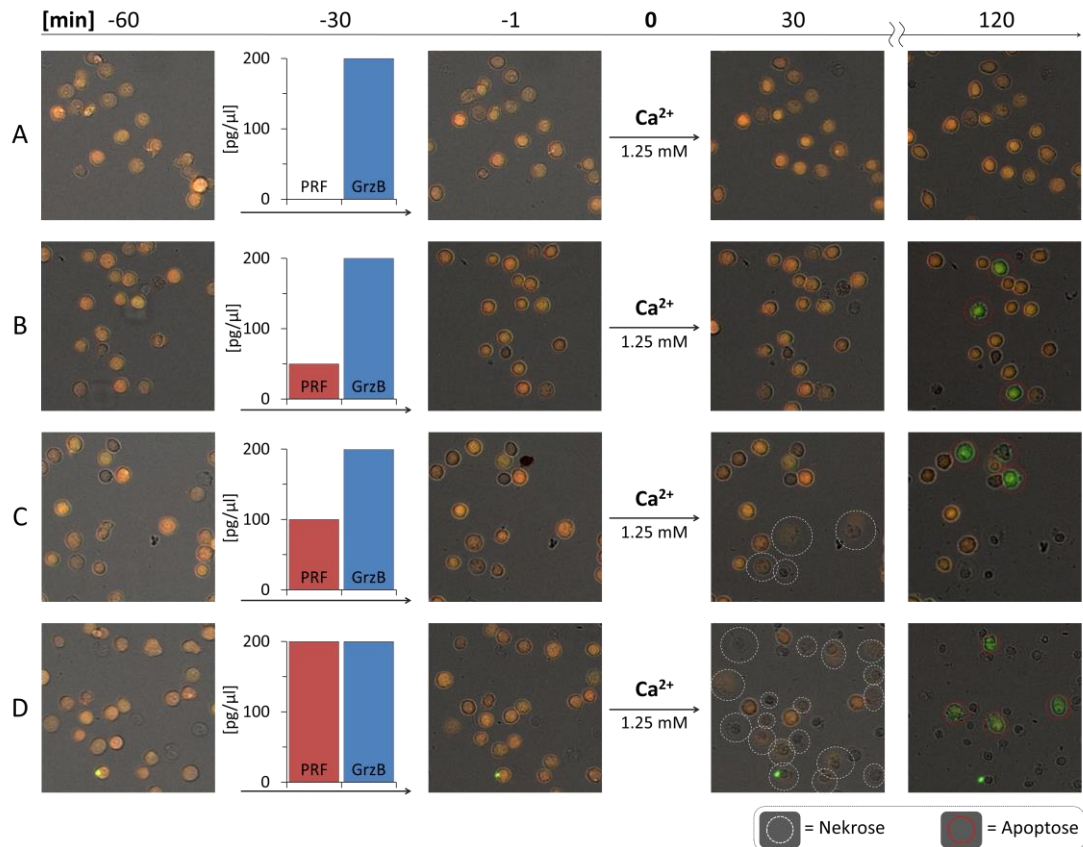


Abbildung 53: Perforin induziert Nekrosen dosisabhängig, Granzym B dringt perforinvermittelt in Zielzellen ein und induziert Apoptosen

Jurkat E 6-1 pCasper wurden in mehreren Wells einer 384-Wellplatte adhärirt, bei 37 °C, 5 % CO₂ in einem kalziumfreien Puffer inkubiert und sequenziell über 4 h im RFP, GFP, FRET und Durchlichtkanal mikroskopiert. Initial wurde über 30 min die Viabilität der Zellen überprüft. Anschließend wurden Perforin sowie Granzym B in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und eine weitere, 30 bis 60 minütige Kontrollphase zur Viabilitätsverifikation angeschlossen. Daraufhin wurde Kalzium in einer Endkonzentration von 1,25 mM zugegeben. Da Perforin eine C2-Kalziumbindedomäne besitzt, wirkt es ab diesem Zeitpunkt lytisch. Abhängig von der Konzentration und dem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Perforin und Granzym B werden unterschiedliche Zelltode ausgelöst. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte der Messung.

(Abb. 53A) Granzym B wird in der zytotoxisch wirksamen Konzentration von 200 pg/ μ l hinzugegeben, jedoch ohne Perforin. Weder zu einem frühen (30 min) noch späten Zeitpunkt (120 min) sind granzymvermittelte Zielzelltode zu beobachten. (Abb. 53B) Granzym B wird wie zuvor in einer Konzentration von 200 pg/ μ l, nun jedoch gemeinsam mit 50 pg/ μ l Perforin zu den Zellen gegeben. Weder in der kalziumfreien Phase, noch zum frühen Zeitpunkt nach Kalziumgabe ist eine Auswirkung zu erkennen. Zum

späten Zeitpunkt werden Zielzellen apoptotisch. Die geringe Perforinkonzentration ermöglichte Granzym B durch temporäre Porenbildung das Überwinden der Zielzellmembran. Die Poren konnten von den Zellen zwar repariert werden, jedoch drang Granzym B währenddessen in die Zielzellen ein, aktivierte die Caspasekaskade und induzierte Apoptosen. (Abb 53C) Im Vergleich zum vorherigen Versuch bleibt die Granzym B Konzentration gleich, die Perforinkonzentration wird auf 100 pg/μl erhöht. In der kalziumfreien Phase sind die Zellen weiterhin vital. Zum frühen Zeitpunkt nach Kalziumgabe werden einige Zellen nekrotisch. Die Zellen, die in der Lage waren durch Porenreparatur der Nekrose zu entgehen, haben Granzym B aufgenommen und werden zum späten Zeitpunkt apoptotisch. (Abb. 53D) Sowohl Granzym B als auch Perforin werden in einer Konzentration von 200 pg/μl hinzugegeben. Auch hier sind die Zellen in der kalziumfreien Phase weiterhin vital. Nach Kalziumgabe sind nahezu alle Zellen zum frühen Zeitpunkt nekrotisch. Die wenigen Zellen, die diese hohe Perforinkonzentration überleben, werden zum späten Zeitpunkt apoptotisch.

Abb.53 zeigt, dass Granzym B Perforin benötigt, um die Apoptose durch Caspaseaktivierung in den Zielzellen zu induzieren. Mit steigender Perforinkonzentration sind die Zielzellen zunehmend mit der Reparatur der Membranschäden überlastet und werden nekrotisch. Das frühe Auftreten von Nekrosen und das dazu verzögerte Einsetzen der Apoptosen folgt den bekannten Kinetiken. In der kalziumfreien Kontrollphase sind die Zielzellen stets vital, was unterstreicht, dass die Insertion von Perforin in die Zielzellmembran aufgrund der C2 Bindedomäne abhängig von extrazellulärem Kalzium ist.

Zur quantitativen Analyse wurden pro Messung im Schnitt 350 Zellen getrackt und die prozentuale Anzahl nekrotischer sowie apoptotischer Zellen bestimmt (Abb. 54).

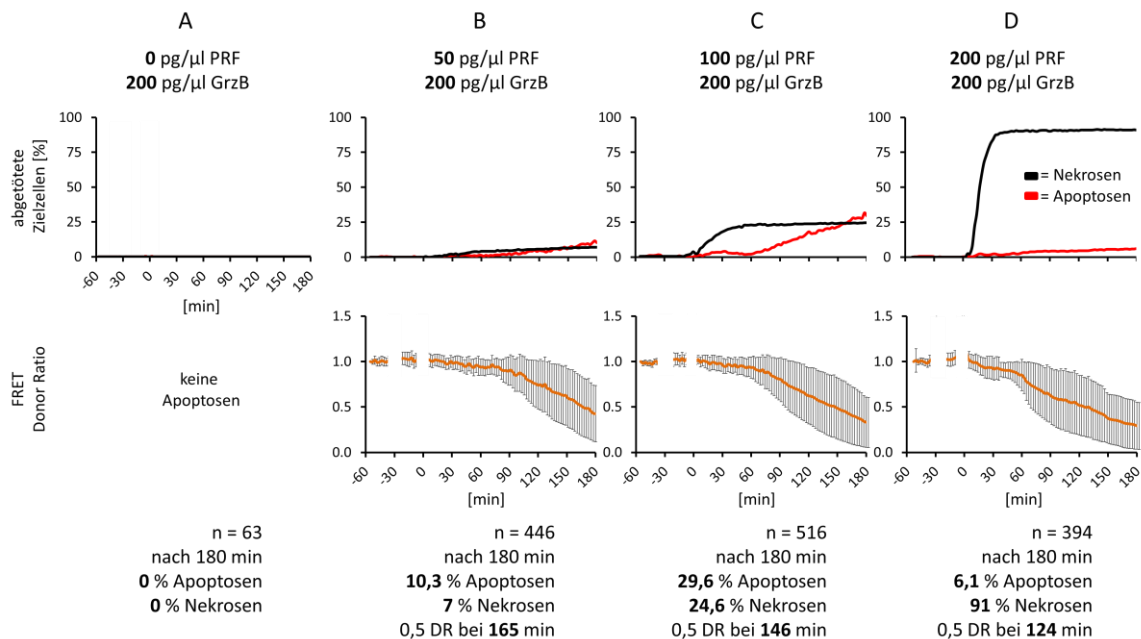


Abbildung 54: Die Anzahl der Nekrosen durch Perforin sowie die Kinetik perforinvermittelter Apoptosen durch Granzym B ist abhängig von der Perforindosis

Der Verlust der RFP-Fluoreszenz wurde als Nekrose-, das Sinken des FRET-Donor Ratio als Apoptosemarker eingesetzt. Da ein automatisiertes Liquid-Handling-System nicht verfügbar war, erfolgte die Zugabe sowohl der Proteine als auch des Puffers manuell. Hierzu wurde der Inkubator geöffnet und die Zugabe während der laufenden Messung händisch durchgeführt. Das Entstehen von Intensitätsartefakten durch Raumlicht war unvermeidlich. Diese Artefakte wurden in der Auswertung ausgeblendet (Lücken bei - 30 sowie - 60 min). Die Aufnahmen wurden mit einem 5-fach Objektiv und daran angepassten LED-Intensitäten durchgeführt, wodurch der GFP/FRET Quotient nicht vergleichbar mit anderen Experimenten ist und pauschal auf 1 normiert wurde. Zellen wurden als nekrotisch definiert, wenn ihr RFP-Signal nach Hintergrundkorrektur auf 0 fiel. Als apoptotisch wurden sie definiert, wenn das Donor Ratio den dreifachen Wert der mittleren Standardabweichung zwischen - 60 und - 30 min unterschritt. Die obere Reihe zeigt die Anzahl apoptotischer sowie nekrotischer Zellen über Zeit, die untere das gemittelte Donor Ratio apoptotischer Zellen sowie die Standardabweichung. Der unruhige Verlauf der Kurven entsteht durch Zellen, deren Wert an der Grenze ist den Schwellwert zu unterschreiten und an dieser Grenze, bedingt durch Messungenauigkeiten sowie Abweichungen der automatischen ROI-Setzung während des Trackings, kurzzeitig schwankt. (Abb. 54A) Nach Gabe von 200 pg/μl Granzym B ohne Perforin entstehen über 4 h weder Apoptosen noch Nekrosen. (Abb. 54B) Werden zusätzlich zu den 200 pg/μl Granzym B 50 pg/μl Perforin gegeben, entstehen 7 % Nekrosen und Granzym B wird zytotoxisch aktiv und induziert 10,3 % Apoptosen. Das Donor Ratio apoptotischer Zellen fällt nach 165 min unter 0,5. (Abb. 54C) Wird die Perforinkonzentration auf 100 pg/μl erhöht, steigt der Anteil nekrotischer Zellen auf 24,6 %, der Anteil der Apoptosen auf 29,6 %. Das Donor Ratio erreicht bereits nach 146 min einen Wert von 0,5. (Abb. 54D) Werden 200 pg/μl Perforin sowie Granzym B eingesetzt, werden mit 91 % nahezu alle Zielzellen nekrotisch, 6,1 % der nekroseresistenten Zielzellen werden apoptotisch. Das Donor Ratio fällt nach 124 min auf 0,5.

Abb. 54 zeigt, dass sowohl die Nekroseinduktion als auch die perforinvermittelte Apoptoseinduktion durch Granzym B abhängig von der Perforindosis sind. Die Abhängigkeit der Nekroseinduktion von der Perforinmenge erklärt sich durch die limitierte Fähigkeit der Zielzelle Perforinporen in ihrer Membran zu reparieren. Übersteigt die Anzahl der Poren das von der Zelle reparierbare Kontingent, stirbt die Zelle durch Lyse nach Membrandisruption.

Die Anzahl temporär vorhandener, reparierter Poren ist maßgeblich ist für die Konzentration an Granzym B, das während der temporären Anwesenheit der Poren in die Zielzelle eindringen kann. Je mehr Granzym B eindringt, desto schneller wird die Caspasekaskade aktiviert und umso schneller sinkt das gemittelte Donor-Ratio.

Neben der perforinvermittelten Aufnahme von Granzym B wird in der Literatur diskutiert, ob Granzym B durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen werden kann. Dies könnte beispielsweise bei einer Anlagerung an die Membran und einer passiven Aufnahme beim Rezeptorrecycling geschehen. Um dies zu überprüfen wurde die Konzentration des Granzym B auf 1250 pg/μl erhöht (Abb. 55).

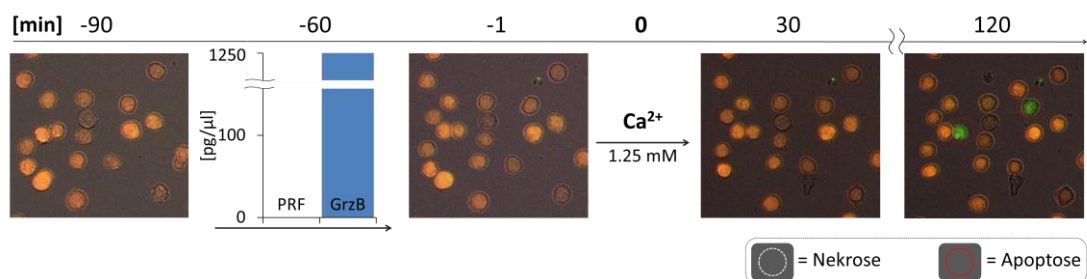


Abbildung 55: Hohe Konzentrationen an Granzym B können passiv ohne Perforinvermittlung in Zielzellen aufgenommen werden und Apoptosen auslösen
Granzym B wurde in einer Konzentration von 1250 pg/μl auf die Zielzellen gegeben.

Abb. 55 zeigt, dass sowohl in der kalziumfreien Phase als auch zum frühen Zeitpunkt nach Kalziumgabe keine Auswirkungen erkennbar sind. Zum späten Zeitpunkt entstehen Apoptosen. Hier wurde Granzym B ohne Perforinuntersützung in die Zielzelle aufgenommen und induzierte Apoptosen.

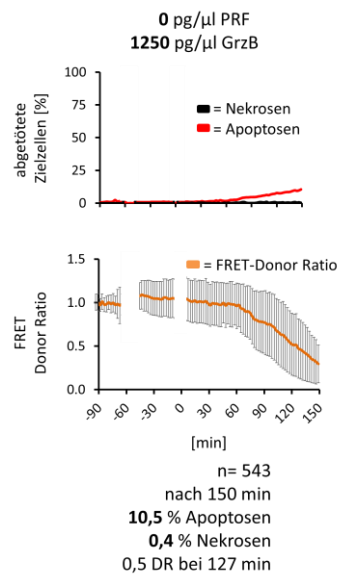


Abbildung 56: Granzym B in hoher Konzentration kann ohne Perforinvermittlung in Zielzellen eindringen und Apoptosen auslösen

Nach 150 min entstehen 10,5 % Apoptosen und 0,4 % Nekrosen. Die Aufnahme muss durch Endozytose erfolgt sein, eine perforinvermittelte Porenbildung fand nicht statt. Das Donor Ratio erreicht nach 127 min einen Wert von 0,5.

Abb. 56 zeigt, dass Granzym B, wenn auch in geringem Maße, in hohen Konzentrationen in der Lage ist, die Zielzellmembran ohne die Hilfe von Perforin zu überwinden. Das Donor Ratio apoptotischer Zellen fällt innerhalb von 127 min auf 0,5.

Abschließend kann festgehalten werden, dass es erfolgreich gelang den Casper3-GR Einzelzellzytotoxizitätsassay für größere Populationen zu etablieren, ihn in einer 384-Wellplatte durchzuführen und ihn zu nutzen, um das Zusammenspiel von Perforin und Granzym B bei der Induktion von Apoptose und Nekrose zu analysieren.

Die apoptotisch sowie nekrotisch abgetöteten Populationsanteile korrelierten mit den eingesetzten Konzentrationen der Proteine, sodass das Verhältnis von Apoptosen zu Nekrosen eingestellt werden kann. Das Funktionsprinzip des Perforin und Granzym B, sowie deren dosis- und stochastische Abhängigkeit voneinander konnte artifiziell nachgestellt werden. Der nekrotische Effekt des Perforin ist dosisabhängig. Die Apoptoseinduktion durch Granzym B ist sowohl an die Granzym B- als auch Perforinkonzentration gekoppelt, da die Granzymwirkung von der temporären Verfügbarkeit der Perforinporen abhängig ist.

Aufgrund von Produktionsausfällen des Herstellers konnte nach Etablierung der Methode und Durchführung der dargestellten Experimente kein weiteres, aufgereinigtes

Perforin geordert werden. Alternative Bezugsquellen konnten trotz intensiver Recherche nicht gefunden werden. Leider konnten deswegen geplante Folgeexperimente zur Analyse der Membranreparaturfähigkeit verschiedener Zelltypen sowie Kalziumabhängigkeit der Perforinwirkung nicht durchgeführt werden.

5.13 Entwicklung einer Analysemethode zur Klassifizierung und Visualisierung des Zelltods

Zielzellen können apoptotisch, nekrotisch oder durch Zwischenformen sterben. Bei diesen Zwischenformen kann es entweder während der Nekrose zur Caspaseaktivierung kommen, oder finalapoptotische Zellen können zur Sekundärnekrose übergehen. Der Hauptunterschied aller Zelltode ist, ob die getötete Zelle lysiert und potentiell infektiös, im Zytosol befindliche Pathogene in die Umgebung abgibt, oder als geschlossenes (apoptotisches) Kompartiment stirbt. Dieses kann von Makrophagen aufgenommen und phagozytiert werden. Lysieren die Zielzellen durch Nekrose, regt dies das Immunsystem an und zieht weitere Abwehrzellen in das entzündete Areal, um die Infektion kooperativ zu bekämpfen (Majno, La Gattuta, and Thompson 1960; Rock and Kono 2008). Lysieren die Zellen nicht und können ohne Freisetzung zytosolischer Botenstoffe von Makrophagen abgebaut werden, fällt die Aktivierung kooperativer Immunzellen entsprechend geringer aus (Huynh, Fadok, and Henson 2002; Rock and Kono 2008). Werden die Casper3-GR Zielzellen auf Einzelzellebene getracked und ihr Fluoreszenzsignal über Zeit ausgelesen, kann die Art des Zelltodes für jede Zelle individuell quantifiziert werden. Die Gesamtheit dieser Verläufe gibt Aufschluss über das Verhalten der Gesamtpopulation. Es kann somit bestimmt werden, ob Zielzellen sich bei bestimmten Umgebungsbedingungen mehr oder weniger immunaktivierend verhalten. Die Auswertung erfolgt nach dem Tracking abgetöteter Zielzellen durch Bewertung der RFP-Fluoreszenz als Nekrosemarker sowie des Donor Ratios als Apoptosemarker. Die dynamische Veränderung dieser Werte wird in einem 2D-Plot dargestellt. Der Graph jeder Zelle beginnt bei 1/1. Wird sie apoptotisch, bewegt sich der Graph entlang der x-Achse in Richtung 0/1. Die Apoptose wird durch das fallende Donor Ratio quantifiziert. Wird die Zelle nekrotisch, bewegt sich der Graph entlang der y-Achse in Richtung 1/0. Die Nekrose wird durch das Sinken der RFP-Fluoreszenz quantifiziert. Je nach Verlauf

und Endpunkt des Graphen kann bestimmt werden, ob eine Apoptose, Nekrose mit oder ohne Caspaseaktivität oder Sekundärnekrose stattfand. Weiterhin ist ersichtlich, welchen quantitativen Anteil der apoptotische bzw. nekrotische Vorgang am Tod der Zielzelle hatte. Mögliche Verläufe sind beispielhaft in Abb. 57 dargestellt.

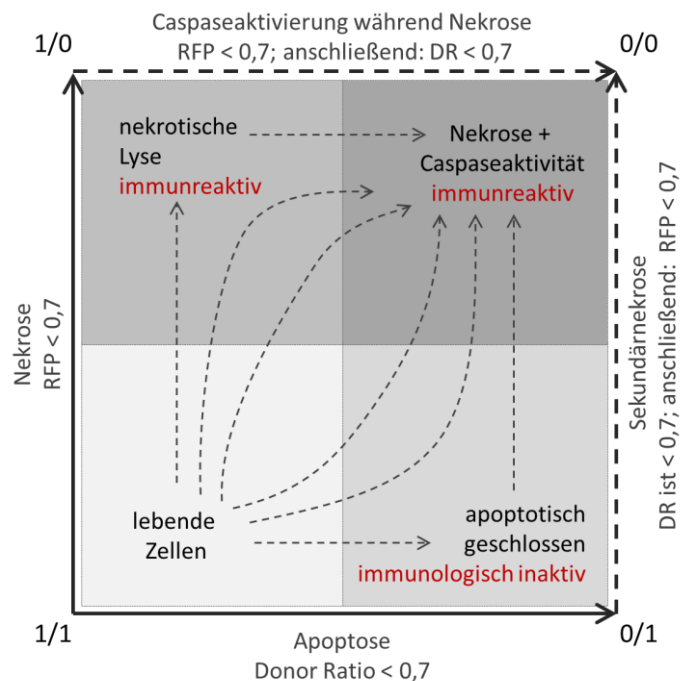


Abbildung 57: 2D-Plot zur Klassifizierung der Dynamik des Zelltodes

Das RFP- und Donor Ratio-Signal wird als Nekrose- sowie Apoptosemarker gegeneinander aufgetragen. Fällt das RFP-Signal rapide, ist die Zelle nekrotisch. Sinkt das Donor Ratio-Signal, ist die Zelle apoptotisch.

Die Verläufe zeigen weiterhin, ob die Zielzellen immunaktivierend sterben. Apoptotische Zellen bleiben ein geschlossenes Kompartiment, sind daher weniger immunaktivierend als lysierte, nekrotische Zellen (Huynh, Fadok, and Henson 2002; Kono and Rock 2008; Majno, La Gattuta, and Thompson 1960). Diese setzen zytosolische Bestandteile in das Gewebe frei, welche als Botenstoffe weitere Immunzellen innervieren. Die physiologische Konzentration freien Kalziums im Blutplasma sowie Geweben beträgt ungefähr 1,2 mM. Werte von Kalziumkonzentrationen in Gewebe, insbesondere entzündetem Gewebe, sind bislang nicht bekannt, da diese Messungen mit den verfügbaren Elektroden bzw. Indikatoren nicht ohne erheblichen Aufwand zu realisieren sind. Man kann spekulieren, dass die Konzentration freien, extrazellulären Kalziums in entzündeten Geweben sinkt, da die aktivierten, stoffwechselaktiven Zellen Kalzium aufnehmen um intrazelluläre Signale zu generieren. Da Kalzium als ubiquitärer second

messenger fungiert, ist ebenfalls zu erwarten, dass veränderte, extrazelluläre Kalziumkonzentrationen eine Auswirkung auf das Abtötungsverhalten der NK-Zellen haben. Um dies zu überprüfen, wurden Jurkat E6-1 pCasper gemeinsam mit NK-Zellen über 2 h in zwei verschiedenen Kalziumpuffern (0 sowie 1 mM) inkubiert und mikroskopiert (Abb. 58).

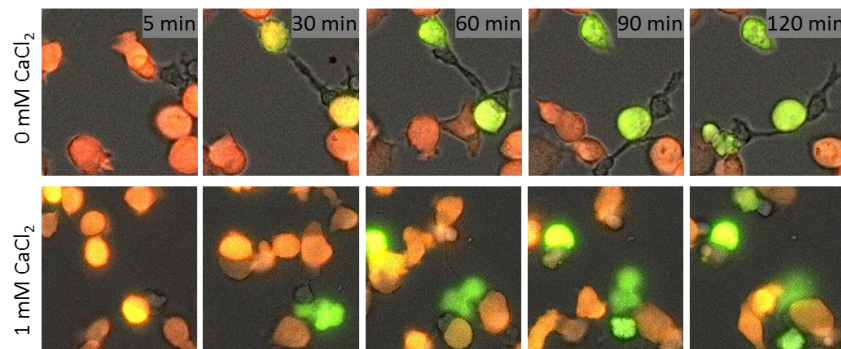


Abbildung 58: NK-Zellen töten Jurkat E6-1 pCasper sowohl im 0 mM als auch 1 mM Kalziumpuffer ab.

Jurkat E6-1 pCasper wurden auf fibronectinbeschichteten Coverslips gemeinsam mit NK-Zellen in Kalziumpuffer über 2 h mikroskopiert. NK-Zellen können Jurkat E6-1 pCasper grundsätzlich sowohl vesikelbasiert als auch rezeptorbasiert abtöten. Befinden sie sich in Puffer mit 0 mM Kalzium, beeinflusst dies die vesikelbasierte Zytotoxizität.

Abb. 58 zeigt, dass die auf Fibronectin adhärennten NK-Zellen zu den Zielzellen migrieren und abhängig vom Kalziumgehalt des Puffers Apoptosen, Nekrosen sowie Zwischenformen auslösen. Je nach Verfügbarkeit extrazellulären Kalziums verändert sich die Zytotoxizität der NK-Zellen.

Alle abgetöteten Zielzellen werden über den gesamten Experimentverlauf getrackt und die Fluoreszenzwerte ausgelesen. Nach Hintergrund- und Bleichkorrektur wird die RFP-Fluoreszenz sowie das Donor Ratio über F/F_0 normiert. Bei lebenden Kontrollzellen wird der Beginn der Messung als F_0 definiert, bei abgetöteten Zielzellen der Beginn des Zelltodes. Das Donor Ratio wird aus den normierten FRET- bzw. GFP-Fluoreszenzen berechnet, sodass sowohl der RFP-Wert (Nekrosemarker) als auch das Donor-Ratio (Apoptosemarker) lebender Zellen bei 1 beginnt (Abb. 59).

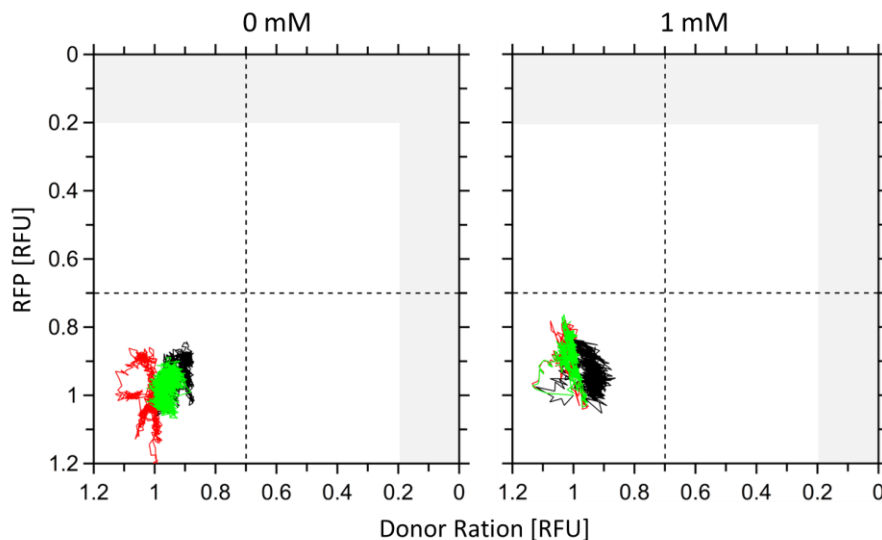


Abbildung 59: Vitale Zellen befinden sich im 2D-Plot bei $1/1 \pm 20\%$.

Für jede Bedingung werden beispielhaft je drei vitale Zellen gezeigt. Die Oszillation der Werte entsteht durch Bewegungs- und Messartefakte. Flacht sich die gemessene Zelle durch Eigenbewegung ab, kann sich das mittlere RFP-Signal in der ROI verringern, eine Abkugelung analog zum Signalanstieg. Das Donor Ratio wird aus dem FRET- sowie GFP-Signal errechnet. Die Kanäle werden sequenziell aufgenommen, sodass die Morphologieveränderung der Zelle zwischen der Akquise beider Kanäle zur Intensitätsveränderungen und somit Oszillation des errechneten Donor Ratio führt. Zur Definition, wann abgetötete Zellen als nekrotisch bzw. apoptotisch gelten, werden Schwellwerte anhand der Fluoreszenzen vitaler Zellen bestimmt. Vitale Zellen oszillieren für beide Marker von 1,2 bis 0,8. Nach Einbeziehen eines Sicherheitspuffers werden Zellen mit einem RFP-Signal $< 0,7$ als nekrotisch, Zellen mit einem Donor Ratio $< 0,7$ als apoptotisch definiert.

Wie Abb. 59 zeigt, schwanken vitale Zellen durch Bewegungsartefakte mit $\pm 20\%$ um den Punkt 1/1. Daher werden sowohl die x- als auch y-Achse von 1,2 bis 0 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) dargestellt. Vorversuche zeigten weiterhin, dass die Zelltodmarker Werte $< 0,2$ kaum erreichen. Die Diffusion des RFP-Nekrosemarkers während der zweistündigen Messzeit ist limitiert, sodass bei einer nekrotischen Lyse nur selten Werte unter 20 % der Ausgangsfluoreszenz erreicht werden. Die Veränderung des Donor Ratio während einer Apoptose wird durch das Unquenching des GFP sowie die Minderung des FRET-Signales bestimmt. Aufgrund der enzymatischen Limitierung beider Vorgänge sinkt das F/F₀ normierte Ratio während einer Apoptose nicht unter 0,2. Bereiche $< 0,2$ werden im Diagramm daher grau dargestellt.

Abb. 60 zeigt beispielhaft je 15 durch NK-Zellen abgetötete Zielzellen in 0 mM sowie 1 mM Kalziumpuffer. In der 0 mM Bedingung wurden 4, in der 1 mM Bedingung 6 repräsentative Verläufe in schwarz hervorgehoben. Die restlichen Verläufe wurden in

roter Farbe hinterlegt, um das Gesamtverhalten der analysierten Zellen zu visualisieren.

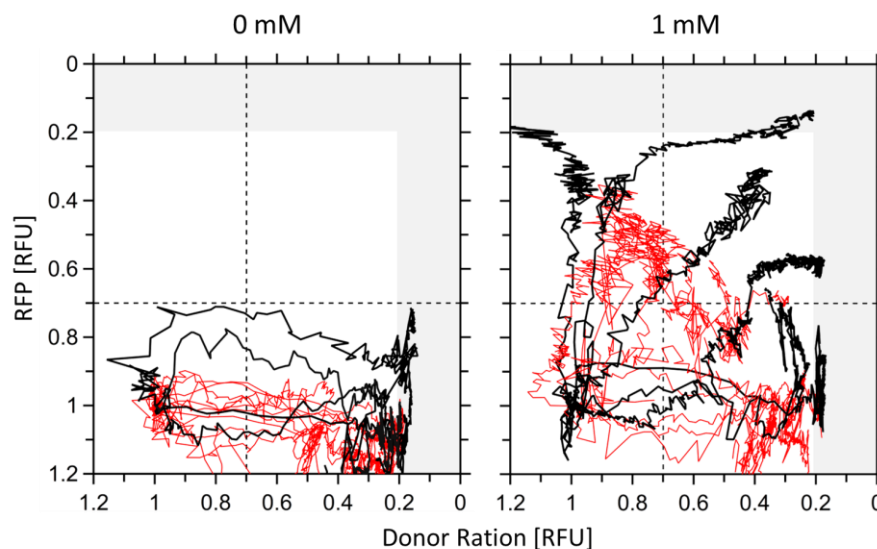


Abbildung 60: In 0 mM Kalziumpuffer lösen die NK-Zellen ausschließlich Apoptosen aus, in 1 mM Kalziumpuffer zusätzlich Nekrosen sowie Zwischenformen

In Abwesenheit extrazellulären Kalziums verursachen NK-Zellen ausschließlich Apoptosen. Alle abgetöteten Zielzellen bewegen sich im Diagramm in den nicht immunaktivierenden, rein apoptotischen Bereich (0/1). Da die durch enzymatische Spaltung sterbende Zelle ihre Membranintegrität erhält und zusätzlich schrumpft, kommt es zu einem morphologisch bedingten Anstieg der RFP-Intensität. Finalapoptotische, geschrumpfte Zellkompartimente können sich daher im Plot bei RFP-Werten > 1 befinden. Es wurden 15 durch NK-Zellen abgetötete Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen analysiert. Alle starben apoptotisch. In Anwesenheit von Kalzium verursachen die NK-Zellen sowohl Apoptosen als auch Nekrosen und Zwischenformen. Während der Entstehung der Nekrosen können, je nach Diffusionsgeschwindigkeit des Zytosols lysierter Zellen, Caspasen aktiviert und somit ebenfalls apoptotisch werden. Zellen dieses Zwischentyps bewegen sich zunächst entlang der Achse 1/0 in den immunreaktiven, nekrotischen Bereich und wandern dann in den ebenfalls immunreaktiven Bereich 0/0 ein. Analog dazu können apoptotische Zellen, deren Caspasekaskade die Zellen durch enzymatische Spaltung entlang der Achse 0/1 verschiebt, lysiert werden. Diese Zellen bewegen sich aus dem nicht reaktiven, apoptotischen Bereich 0/1 in den immunreaktiven Bereich 0/0 ein. Von 15 analysierten Zielzellen starben 2 rein nekrotisch, 5 durch Nekrose mit Caspaseaktivität, 1 durch Sekundärnekrose und 7 durch Apoptose.

Die beiden Kalziumkonzentrationen verursachen einen radikalen Unterschied im Abtötungsverhalten der NK-Zellen. Ist kein Kalzium vorhanden, sterben die Zielzellen ausschließlich durch Apoptose. Nekrosen werden nicht initiiert. Kalzium wird, in Anlehnung an die Ergebnisse der NK-Zell freien Induktion von Apoptosen und Nekrosen durch aufgereinigtes Perforin und Granzym B, von der C2-Bindedomäne des Perforins zur Anlagerung an die Zielzellmembran benötigt. Nur in Anwesenheit extrazellulären Kalziums sind NK-Zellen in der Lage, die Zielzellen immunaktivierend abzutöten und dadurch eine kooperative Immunantwort zu provozieren.

Der wichtigste Vorteil der Darstellung in Abb. 60 ist, dass sie auf einen Schlag ermöglicht die verschiedenen Dynamiken des Zelltodes zu klassifizieren, quantifizieren und visualisieren: Nekrotische Zellen mit und ohne Caspaseaktivität sowie sekundärnekrotische Zellen können eindeutig voneinander unterschieden werden. Das Verhalten der Gesamtpopulation ist auf einen Blick ersichtlich und der Vergleich zweier Diagramme ermöglicht den sofortigen Rückschluss, ob veränderte Umgebungsvariablen das Abtötungsverhalten der NK-Zellen populationsweit beeinflussen.

5.14 Regulation des Apoptose- / Nekrosegleichgewichtes

Ein Standbein aktueller Krebstherapie ist es, die antikörpervermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegen kanzerogene Zellen zu initiieren bzw. intensivieren. Hierzu werden dem Patienten monoklonale, möglichst spezifisch gegen die Krebszellen gerichtete Antikörper injiziert. Nach Bindung der Antikörper an die Krebszellen dienen diese den NK-Zellen als Aktivierungssignal (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Zur Optimierung dieser Therapieform ist man bemüht die Anzahl der NK-Zellen zu erhöhen, indem diese ex vivo expandiert werden. Diese expandierten Zellen wirken in in vitro Experimenten synergistisch mit den NK-Zellen sowie den monoklonalen Antikörpern und vermitteln eine erhöhte Zytotoxizität (Deng et al. 2012). Weiterhin versucht man, die Zytotoxizität durch Beeinflussung der NK-Zell-Rezeptoren zu optimieren. Hierzu bindet man aktivierende Antikörper an NK-Zell aktivierende Rezeptoren, NK-Zell inaktiverende Rezeptoren werden geblockt (Mentlik James, Cohen, and Campbell 2013). Der Versuch die NK-Zell Zytotoxizität durch Steuerung des Apoptose- / Nekrose-ratio zu regeln ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Durch Beeinflussung dieses Ratios könnte die Effizienz der Immunantwort durch gezieltes Hervorrufen immunreaktiver bzw. nicht reaktiver Arten des Zelltodes gesteuert werden.

Nekrosen wirken immunreaktiv, Apoptosen nicht (Rock and Kono 2008). Um das immunaktivierende Verhalten von NK-Zellen zu beeinflussen, müssen die zytotoxischen Mechanismen reguliert werden. NK-Zellen üben ihre Zytotoxizität grundsätzlich durch die Exozytose zytotoxischer Vesikel aus (die sowohl Apoptosen als auch Nekrosen auslösen können), als auch über die Kopplung apoptoseinduzierender Rezeptoren (Fas-Rezeptor CD95 und –Ligand CD178). Die Beeinflussung dieser Faktoren sollte es er-

möglichen, das Verhalten der NK-Zellen zu steuern und als Endziel die Optimierung einer NK-Zell basierten Immuntherapie zu ermöglichen.

Die Abhängigkeit nekrotischer Zielzellabtötung von extrazellulärem Kalzium wurde bereits in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beschrieben. Perforin besitzt eine C2-Bindedomäne, welche mindestens 100 nM extrazelluläres Kalzium benötigt, um die Anlagerung an die Zielzellmembran zu ermöglichen (I. Voskoboinik et al. 2005).

Eine weitere Möglichkeit die Zielzelltötung durch Nekrosen zu beeinflussen, ist die Manipulation zytotoxischer Vesikel durch das Pharmakon Concanamycin A (CMA). CMA ist ein spezifischer Blocker der vakuolären Protonenpumpe (Kataoka et al. 1996). Wird die Pumpe geblockt, wird H^+ nicht mehr in die Vakuolen gepumpt, wodurch der saure pH der Vesikel ansteigt. Das in den Vesikeln gespeicherte Perforin wird inaktiviert. Abb. 61 zeigt Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen, die gemeinsam mit NK92 inkubiert werden. Im Ansatz ohne CMA können die NK92 den Zielzelltod sowohl durch Vesikel als auch den Fas-Rezeptor auslösen. Werden die NK-Zellen mit CMA vorinkubiert, degradiert Perforin und das vesikelvermittelte Abtöten der Zielzellen wird beeinflusst.

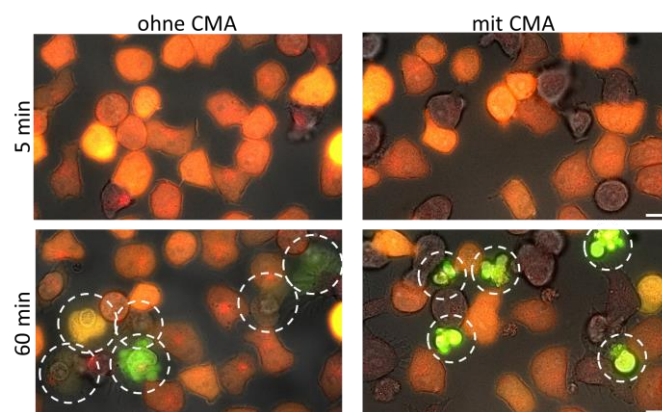


Abbildung 61: CMA inkubierte NK92 induzieren in Jurkat E6-1 pCasper ausschließlich Apoptosen
NK92 wurden über 4 h mit CMA inkubiert, gewaschen und anschließend gemeinsam mit Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen in CMA-freiem Medium mikroskopiert. Während des Experimentes befindet sich kein CMA im Medium, eine Beeinflussung der Zielzellen durch CMA ist ausgeschlossen. Alle NK92 wurden mit LysoTracker Red vorinkubiert. Durch den gestiegenen pH in den Vesikeln CMA-behandelter NK92 ist es nicht mehr möglich, den acidophilen Farbstoff zu laden.

Abb. 61 zeigt, dass nach 5 min die NK92 in beiden Ansätzen immunologische Synapsen zu den Zielzellen ausgebildet haben. In den LysoTracker-gefärbten NK92 ist die Polari-

sation zytotoxischer Vesikel zu den Zielzellen erkennbar. Nach 1 h wurden in beiden Ansätzen Zielzellen getötet. Im unbehandelten Ansatz sind alle Zustände möglicher Zielzelltötung erkennbar: Nekrosen mit sowie ohne Caspaseaktivität sowie eine Apoptose. Die Inkubation der NK92 mit CMA führt zum Funktionsverlust des Perforin, die Zielzellen werden ausschließlich apoptotisch getötet. Die fehlende Akkumulation des acidophilen LysoTracker in den Vesikeln bestätigt deren veränderten pH. Um die Funktion des CMA auf Populationsebene in primären NK zu bestätigen, wurden diese mit CMA vorinkubiert und gemeinsam mit Jurkat E6-1 pCasper oder K562 pCasper mikroskopiert (Abb. 62).

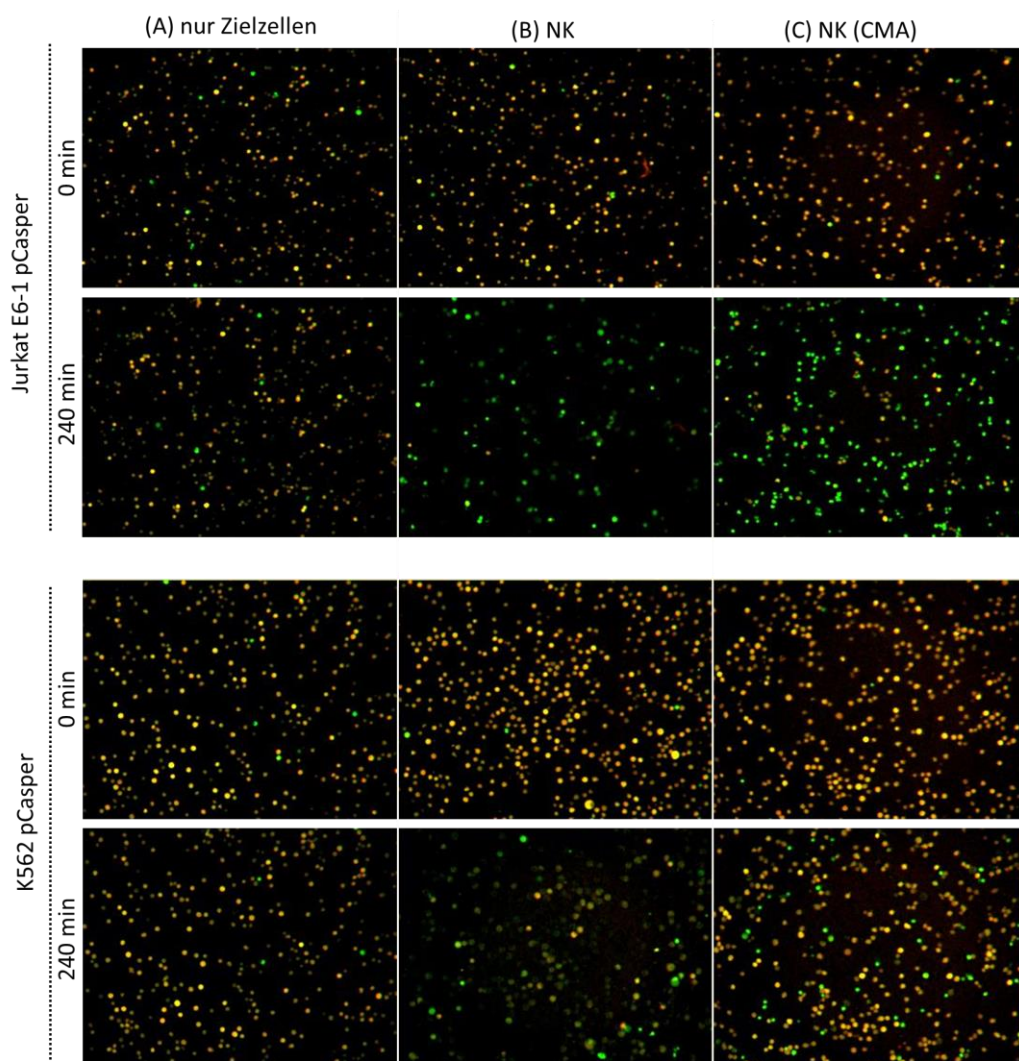


Abbildung 62: CMA-inkubierte NK-Zellen töten ausschließlich durch Apoptoseinduktion

NK-Zellen wurden mit CMA inkubiert, gewaschen und mit Jurkat E6-1 pCasper oder K562 pCasper Zielzellen über 4 h mikroskopiert.

Abb. 62 Spalte A zeigt die Vitalitätskontrolle ohne NK-Zellen. Beide Zielzelllinien sind über die gesamte Messzeit vital. Die Positivkontrolle in der mittleren Spalte (Abb. 62 Spalte B) zeigt, dass NK-Zellen bei Jurkat E6-1 pCasper sämtliche möglichen Zielzelltode auslösen, es sind leuchtend grüne Apoptosen, verwaschen grüne Nekrosen mit Caspaseaktivität sowie nahezu schwarze Nekrosen ohne Caspaseaktivität vorhanden. K562 pCasper werden aufgrund des fehlenden Fas-Rezeptors CD95 ausschließlich nekrotisch, sowohl mit als auch ohne Caspaseaktivität getötet. Die rechte Spalte (Abb. 62 Spalte C) zeigt, dass CMA-inkubierte NK-Zellen bei Jurkat E6-1 pCasper keine Nekrosen auslösen, nach 240 min sind ausschließlich leuchtend grüne Apoptosen erkennbar. Das Abtöten der K562 pCasper wird durch die CMA-Inkubation der NK-Zellen nahezu vollständig verhindert. Es sind keine Nekrosen erkennbar, lediglich wenige Apoptosen wurden induziert.

Die CMA-Vorinkubation verhindert demnach auch bei primären, humanen NK-Zellen die Induktion von Nekrosen. Zielzellen werden ausschließlich apoptotisch getötet (Abb. 62 Spalte C). Bei Jurkat E6-1 pCasper bedeutet dies, dass aus dem gesamten Spektrum möglicher Zielzelltode ausschließlich Apoptosen übrig bleiben. K562 pCasper besitzen keinen Fas-Rezeptor (CD95) und werden standardmäßig ausschließlich durch Nekroseinduktion getötet. Die CMA-Inkubation von NK-Zellen verhindert somit nahezu vollständig deren Abtötung.

Auffällig ist, dass nach vierstündiger Inkubation ein geringer Anteil Apoptosen entstehen. Dies kann durch zwei mögliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen, dass in seltenen Fällen Granzym B ohne die Hilfe von Perforin die Zielzellmembran durchquert hat. Diese Möglichkeit wird durch die Ergebnisse der Versuche mit hohen Konzentrationen mit aufgereinigtem Granzym B (5.12) gestützt. Zum anderen ist es denkbar, dass die NK-Zellen während des Experimentes, welches ohne CMA-Einfluss durchgeführt wird, Perforin in funktionsfähigen Vesikeln nachgebildet haben. Da das nachgebildete Perforin nur in geringen Mengen vorliegt, hat dessen Konzentration nicht zur Lyse der Zielzellmembran wohl aber zur Aufnahme von Granzym B ausgereicht, wodurch in einigen K562 pCasper die Caspasekaskade aktiviert wurde. Um den Einfluss von CMA auf NK-Zellen populationsweit zu quantifizieren, wurden real-time killing Assays durchgeführt (Abb. 63).

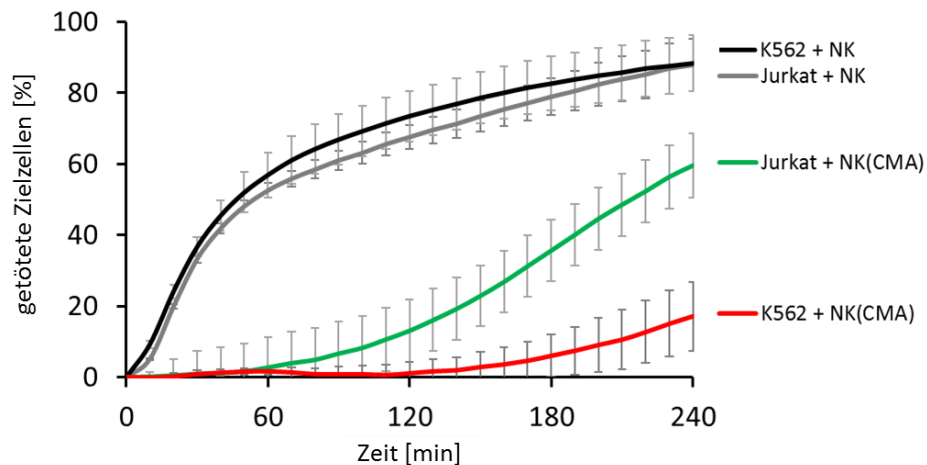


Abbildung 63: CMA behandelte NK-Zellen töten K562 nicht, Jurkat E6-1 ausschließlich durch Apoptosen

Native sowie CMA-vorinkubierte NK-Zellen wurden mit calceingeladenen Jurkat E6-1 und K562 über vier Stunden im real-time killing Assay inkubiert. Fünf Assays wurden gemittelt und der Standardfehler berechnet.

In den Kontrollen wurden die Zielzellen > 87 % getötet. CMA vorinkubierte NK-Zellen töten Jurkat E6-1 zu 59 %, wobei die anfängliche, bei der Positivkontrolle sigmoidal ansteigende Abtötungsphase deutlich abweicht. Es fehlt das schnelle, perforinvermittelte Abtöten, sodass der lineare Anstieg getöteter Jurkat E6-1 Zellen rein durch rezeptorvermittelte Apoptosen ausgelöst wird. Abgetötete K562 werden bis 150 min nach Experimentbeginn nicht detektiert. Bis zum Experimentende nach 240 min steigt die Zahl abgetöteter K562 auf 17 %, ausgelöst entweder durch während des Experimentverlaufs neu gebildeten Perforins oder perforinfreier Induktion von Apoptosen durch Granzym B.

Die CMA-Inkubation von NK-Zellen verhindert die Abtötung von Zielzellen durch Nekrosen. In Experimenten, in denen im nativen Zustand Nekrosen ausgelöst werden, wird das Abtöten auf den nicht immunaktivierenden, apoptotischen Modus reduziert. In Experimenten, bei denen ausschließlich Nekrosen ausgelöst werden, wird die Zytotoxizität nahezu vollständig ausgeschaltet.

Eine weitere Einflussmöglichkeit auf das Abtötungsverhalten der NK-Zellen besteht in der Beeinflussung des Fas-Liganden CD178. Dieser kann mit einem monoklonalen Antikörper als kompetitiver Inhibitor zum Fas-Rezeptor CD95 blockiert werden (Kayagaki, Okumura, and Yagita 1995). Um den Einfluss der Fas-Ligand vermittelten Zytotoxizität

auf die Gesamtzytotoxizität der NK-Zellen zu bestimmen, wurden Jurkat E6-1 pCasper als Zielzellen gewählt. Bei diesen kann der Zelltod sowohl durch Vesikel, als auch durch Kopplung des Fas-Ligand an seinen Rezeptor vermittelt werden. Durch Blockieren des Fas-Liganden CD178 sollte es möglich sein, dessen Anteil an der Gesamtzytotoxizität gezielt zu eliminieren (Abb. 64).

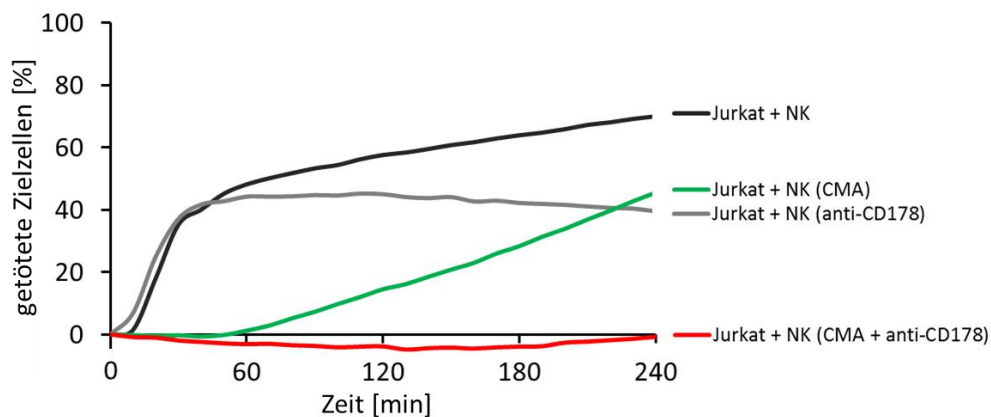


Abbildung 64: Durch anti-CD178 Antikörper kann die Fas-vermittelte Zytotoxizität gezielt ausgeschaltet werden

NK-Zellen wurden mit CMA und/oder anti-CD178 Antikörper 4 Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend gewaschen und gemeinsam mit calceingeladenen Jurkat E6-1 im Platerader über 4 Stunden im real-time Killingassay gemessen. Es wurde nur ein Spender ausgewertet. Durch Unregelmäßigkeiten in der NK-Isolation sowie Hardwareprobleme konnten in weiteren Versuchen nur inkomplette Datensätze erhoben werden. Es konnte kein Standardfehler berechnet werden.

In der Positivkontrolle (schwarze Linie) werden die Zielzellen zu 70 % abgetötet, mit einem sigmoidalen Anstieg (schnelle Killingphase) während der ersten Stunde. Werden die Zellen mit CMA vorinkubiert (grüne Linie), töten sie die Zielzellen zu 45 %, die schnelle Phase fehlt und die Abtötungsrate steigt ab 60 min linear an. Wie in Abbildung 63: CMA behandelte NK-Zellen töten K562 nicht, Jurkat E6-1 ausschließlich durch Apoptosen beschrieben fehlt das vesikelvermittelte, nekrotische Abtöten. Werden die NK-Zellen mit anti-CD178 inkubiert (graue Linie), werden die Zielzellen zu 39 % abgetötet, wobei dies ausschließlich innerhalb der ersten Stunde geschieht. Hier fand nekrotisches, schnelles Killing statt. Durch das Fehlen des Fas-vermittelten, linear ansteigenden, apoptotischen Killings, steigt die Kurve nach 60 min nicht weiter an. Kombiniert man den Einfluss des CMA sowie anti-CD178 auf NK-Zellen (rote Linie), ist deren Zytotoxizität komplett eliminiert.

Wie Abb. 64 zeigt, hat das Fas-vermittelte Abtöten einen linearen Einfluss auf die NK-Gesamtzytotoxizität. Unter der sinnvollen Annahme, dass CMA spezifisch Nekrosen

und der anti-CD178 Antikörper spezifisch Apoptosen blockt, zeigt sich, dass Nekrosen den schnellen, ersten Anteil verursachen, Apoptosen den linear ansteigenden, andauernden Anteil. Dies steht im Einklang mit bereits gezeigten Ergebnissen, in denen Nekrosen als Zielzelltötungen identifiziert wurden, die in schneller Folge zu Beginn der NK-Aktivität stattfinden (siehe 5.10). Auch wurde gezeigt, dass NK-Zellen, wenn sie initial Nekrosen induziert haben, auf den apoptoseauslösenden Modus übergehen und nicht zurückwechseln. Dies wird durch den zunächst sigmoidal, anschließend linear ansteigenden Abtötungsverlauf, sowie das Fehlen des sigmoidalen Verlaufes bei CMA-Inkubation, bestätigt.

Zusammengenommen ist die Beeinflussung der NK-Zellen durch CMA sowie anti-CD178 Antikörper eine wirksame Methode, um das Abtötungsverhalten der NK-Zellen auf die apoptotische oder nekrotische Seite des möglichen Spektrums zu verlagern. NK-Zellen können so in der Induktion kooperativer Immunreaktivität gesteuert werden. Bislang wurde dies ausschließlich in 2D, in in vitro Experimenten gezeigt. Da es nicht möglich ist im menschlichen System entsprechende in vivo Experimente durchzuführen, soll im letzten Teil der Arbeit ein 3D-Assay in einer physiologischeren Kollagenmatrix etabliert werden.

5.15 Portierung des Casper3-GR Assay in 3D

Unter Anwendung der Lichtblatt-Mikroskopie, welche 2015 durch das Lightsheet Z.1 von Zeiss als erstes, kommerziell verfügbares System verfügbar gemacht wurde, besteht die technische Möglichkeit einen ausreichend schnellen und räumlich aufgelösten 3D Assay zu etablieren.

Der grundsätzliche Unterschied der Lichtblattmikroskopie gegenüber anderen Mikroskopietechniken ist die Existenz einer getrennten, im rechten Winkel angeordneten Anregungs- sowie Detektionsoptik. Durch diesen Aufbau ist es möglich, die Fluoreszenzanregung einer zentralen, zylindrischen Probe nahezu ausschließlich auf die Fokalebene zu fokussieren, da die Anregungsoptik die Fluoreszenzexcitation zu einem Lichtblatt faltet. Gleichzeitig zur Anregung wird die Fokalebene über die Detektionsoptik ausgelesen. Wird die Ebene in z-Richtung verändert, werden optische Schnitte der

Probe aufgenommen, welche anschließend zu einem 3D-Datensatz zusammengesetzt werden. Durch das gleichzeitige Anregen und Auslesen der Fokalebene sowie der Fokussierung des Anregungslichtes auf die Fokalebene arbeitet das System schneller und probenschonender als andere Mikroskopietechniken. 3D-Datensätze können in schneller Folge als 3D Timelapse aufgenommen werden. Durch den phototoxizitätsminimierenden Aufbau des Systems ist ein 3D-Imaging lebender Zellen über mehrere Stunden möglich.

Voraussetzung zur Nutzung der Technik ist das Einbetten der Probe in ein zylindrisches Gel, dessen Brechungsindex dem von Wasser entspricht. Für Proben mit lebenden, humanen Zellen ist dies Kollagen. Kollagen, isoliert aus Hautgewebe von Rindern, wird mit Ziel- sowie Killerzellen gemischt. Das noch flüssige Kollagen-Zellgemisch wird in eine Glaskapillare aufgezogen und 60 min im Brutschrank ausgehärtet. Anschließend wird die Glaskapillare in das Lightsheet eingesetzt und der Kollagenzylinder aus der Kapillare heraus zwischen Anregungs- und Detektionsoptik geschoben. Die Probenvorbereitung wurde gemeinsam mit Rouven Schoppmeyer und Carsten Kummerow etabliert. Abb. 65 zeigt zwei Ausschnitte einer dreistündigen 3D Aufnahme von Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen sowie LysoTracker gefärbten NK-Zellen in der Kollagenmatrix.

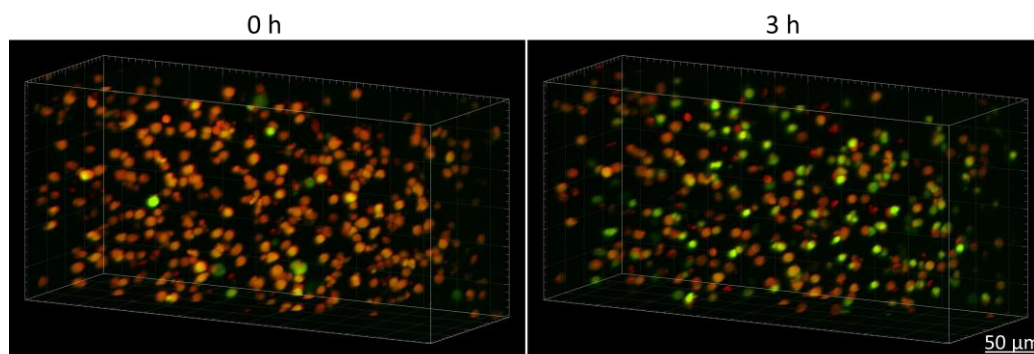


Abbildung 65: NK-Zellen und Jurkat E6-1 pCasper sind über drei Stunden in der Kollagenmatrix vital und migrieren

Jurkat E6-1 pCasper und LysoTracker geladene NK-Zellen wurden in der Kollagenmatrix über 3 h mikroskopiert.

(Abb. 65) Die NK-Zellen migrieren, bilden Synapsen zu den Jurkat E6-1 pCasper und induzieren Apoptosen, Sekundärnekrosen sowie Nekrosen mit und ohne Caspaseaktivität. Alle nach 3 h abgetöteten Zielzellen haben oder hatten Kontakt zu einer NK-Zelle. Zielzellen, die keinen Kontakt zu einer NK-Zelle hatten, sind am Ende der Messung wei-

terhin vital und fluoreszent. Zur Überprüfung der Fluoreszenzeigenschaften des Casper3-GR Sensors wurden Detailaufnahmen gefertigt (Abb. 66).

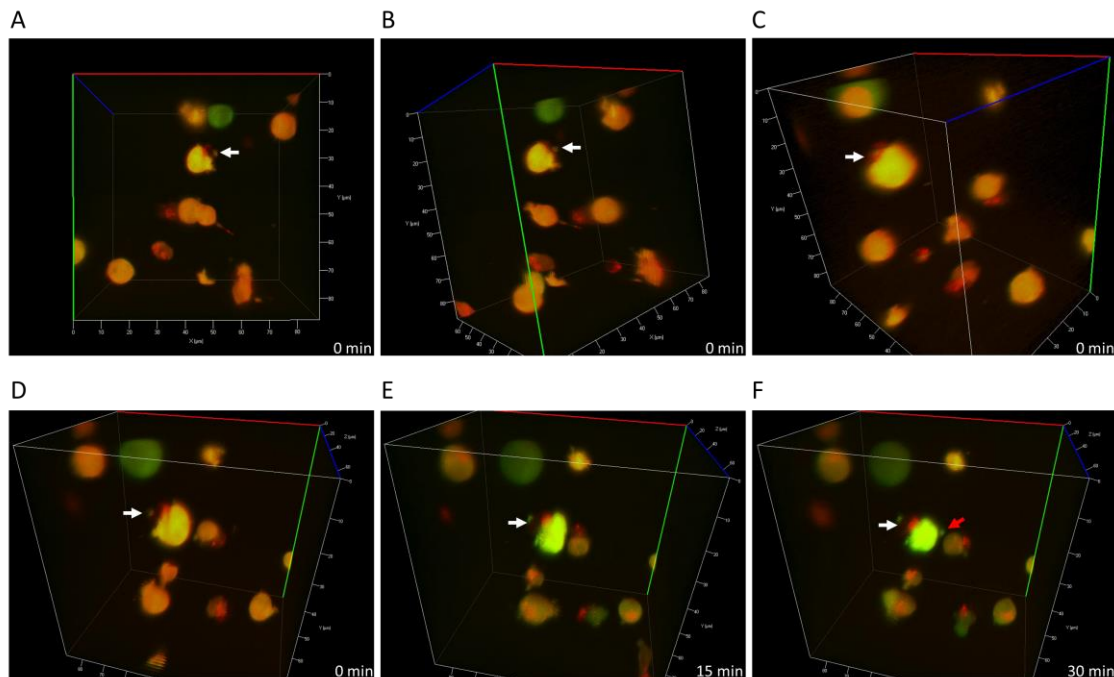


Abbildung 66: NK-Zellen induzieren in der 3D Kollagenmatrix Apoptosen

NK-Zellen wurden mit LysoTracker Red geladen und gemeinsam mit Jurkat E6-1 pCasper in der Kollagenmatrix 30 min in 3D mikroskopiert. Es wurde ein rechteckiger, 90 x 90 x 70 µm großer Aufnahmebereich definiert. (A) Da ausschließlich Fluoreszenzkanäle aufgenommen werden, sind NK-Zellen als Akkumulation zytotoxischer Vesikel erkennbar (weißer Pfeil). (B bis D) wird das Volumen zum Zeitpunkt 0 min gedreht, erkennt man, dass die NK-Zelle Membrankontakt zu der Zielzelle hat und die Vesikel zur Zielzelle lokalisiert sind. Die Kugelform der Zielzelle wird an der IS durch die NK-Zelle eingebeult. (E) Nach 15 min schlägt das Fluoreszenzratio der Jurkat E6-1 pCasper um, die GFP-Fluoreszenz wird unquenched, die FRET-Fluoreszenz sinkt. Im Overlay wird die Zelle grün. (F) Die Zielzelle ist apoptotisch, durchläuft die typischen Morphologieveränderungen, schrumpft und bleibt (roter Pfeil).

Abb. 66 zeigt, dass sowohl NK- als auch Zielzellen in der Kollagenmatrix eine Kugelform annehmen. NK-Zellen bilden immunologische Synapsen und lösen Apoptosen aus. Die Zielzellen zeigen auch in 3D das aus 2D bekannte, morphologische Verhalten der Volumenveringerung (Schrumpfen) sowie Membranausbeulungen (Blebbing). Neben der Apoptose wird auch die Fluoreszenzveränderung während der Nekrose an einer Detailaufnahme überprüft (Abb. 67).

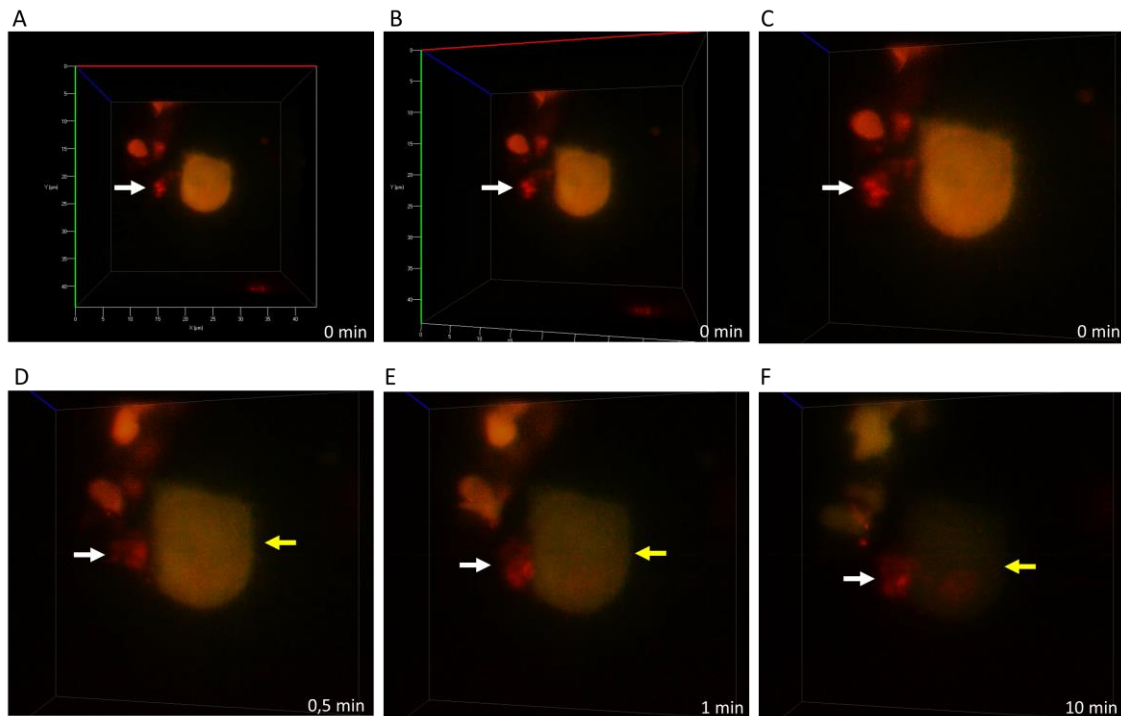


Abbildung 67: NK-Zellen töten Jurkat E6-1 pCasper in der Kollagenmatrix durch Nekrose

LysoTracker Red geladene NK-Zellen wurden mit Jurkat E6-1 pCasper in der Kollagenmatrix in 3D mikroskopiert, es wurde eine Aufnahmeregion mit Kantenlängen 45 x 45 x 45 µm bestimmt und 10 min mikroskopiert. (A bis C) Die NK-Zelle (weißer Pfeil) hat eine IS zur Zielzelle gebildet und relokalisiert die Vesikel zur Zielzelle. Die Kugelform der Zielzelle wird durch den engen Kontakt der NK-Zelle eingebault. (D) Die Vesikel sind zur IS lokalisiert (weißer Pfeil), das Fluoreszenzsignal der Zielzelle fällt in allen Kanälen schlagartig (gelber Pfeil). (E, F) Im Verlauf des Fluoreszenzverlustes ist aufgrund gleichzeitiger Caspaseaktivität eine grünliche Färbung erkennbar.

(Abb. 67) Neben der Induktion von Apoptosen können NK-Zellen die Jurkat E6-1 pCasper in der Kollagenmatrix auch durch die Induktion von Nekrosen abtöten (gelber Pfeil). Vesikelrelokalisierung (weißer Pfeil) und alle anderen, in 2D beobachteten Abläufe (Migration, IS-Bildung, morphologisches Verhalten der Zielzelle) sind in 3D analog beobachtbar.

Zur Verifikation des Fluoreszenzverhaltens wurden die Zielzellen in 3D getrackt, eine automatisch positionierte, sphärische ROI innerhalb der Zielzelle generiert und die mittlere Fluoreszenz aller Kanäle innerhalb dieser ROI zu jedem Zeitpunkt bestimmt (Abb. 68).

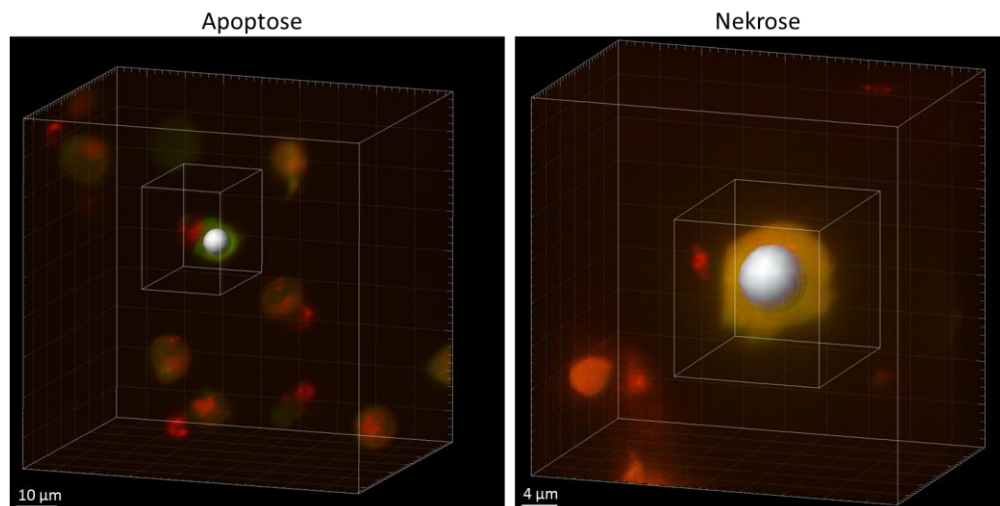


Abbildung 68: Die sphärische ROI zur Bestimmung der Zielzellfluoreszenz kann automatisch generiert werden

Die zu bestimmende Zielzelle wurde durch eine kubische ROI markiert (Würfel innerhalb des Datensatzes). Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen wurden vermessen und ein mittlerer Durchmesser von 10 µm bestimmt. Anhand der GFP-Fluoreszenz wurde eine spärliche ROI mit einem Durchmesser von 8 µm generiert.

(Abb. 68) Die ROI folgt bei Zellbewegung dem Mittelpunkt der Zielzelle. Sie wurde kleiner als der eigentliche Zielzelldurchmesser gewählt, um Einflüsse der LysoTracker Red-Fluoreszenz der NK-Zelle auf den FRET- sowie RFP-Kanal zu minimieren. Zur Verifikation des Fluoreszenzverhaltens des Casper3-GR Sensors bei Apoptose und Nekrose wurden die Fluoreszenzen aller Kanäle ausgelesen und in Abb. 69 dargestellt.

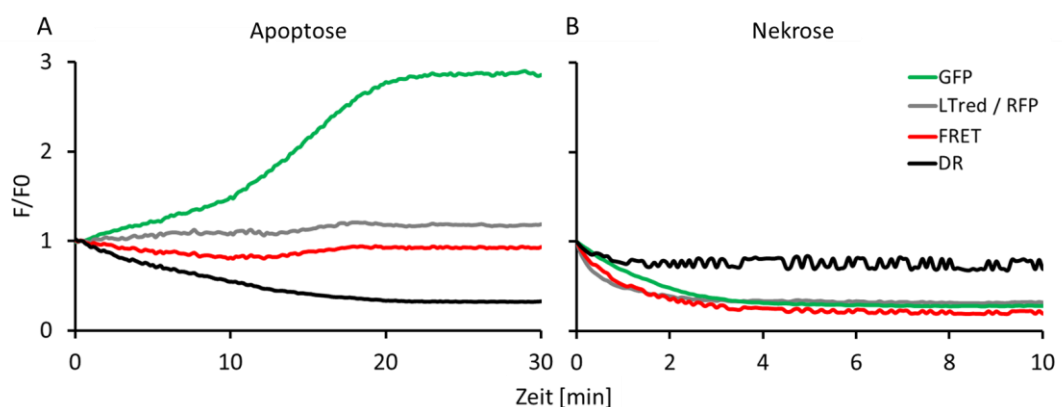


Abbildung 69: Das Fluoreszenzverhalten des Casper-Sensors in der Kollagenmatrix ist analog zum Verhalten in 2D Aufnahmen

Die mittleren Fluoreszenzwerte aller Kanäle der spärlichen ROI wurden hintergrund- und bleich-korrigiert, F/F_0 normiert und über die Zeit geplottet.

(Abb. 69A) Während der Apoptose steigt das die GFP-Fluoreszenz durch Unquenching auf 2,85 RFU, das FRET-Signal fällt auf 0,8. Das RFP-Signal ist nahezu konstant. Sowohl das RFP- als auch FRET-Signal zeigen im Zeitbereich 10 bis 20 min einen Signalanstieg, bedingt durch das Schrumpfen der apoptotischen Zelle und entsprechende Aufkonzentration von Fluophoren in der spärlichen ROI. (Abb. 69B) Während der Nekrose fallen alle Fluoreszenzsignale schlagartig ab. Das FRET-Signal oszilliert während der Lyse durch seine Nähe zur Hintergrundfluoreszenz, was sich auf das berechnete Donor-Ratio überträgt. Sowohl während der Apoptose als auch Nekrose verhält sich der Casper3-GR Sensor analog zu 2D Aufnahmen. Die F/F_0 normierten Donor Ratios sowie RFP Fluoreszenzen wurden exemplarisch für 2 Zellen gegeneinander aufgetragen (Abb. 70).

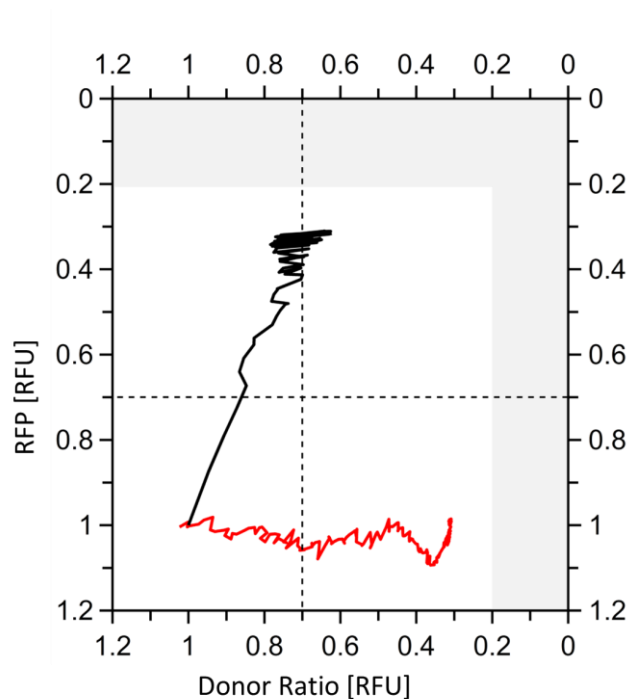


Abbildung 70: Sowohl die Apoptose als auch die Nekrose der in 3D gemessenen Zellen sind im Plot eindeutig klassifizierbar

Die Einteilung des Plot ist analog der Abb. 59 und 60

(Abb. 70) Die Apoptose verläuft entlang der Achse 0/1 in den nicht immunreaktiven, apoptotischen Bereich (roter Plot). Es kam nicht zu einer Sekundärnekrose, der immunreaktive Bereich 0/0 wurde nicht erreicht. Die Nekrose bewegt sich mit vergleichsweise wenig Oszillationen entlang der immunreaktiven Achse 1/0 und endet, aufgrund parallel stattfindender Caspaseaktivität, am Grenzbereich zum Quadranten 0/0.

Nach Etablierung des automatisierten Trackings an Einzelzellen wurde die Auswertung für eine größere Population Einzelzellen durchgeführt.

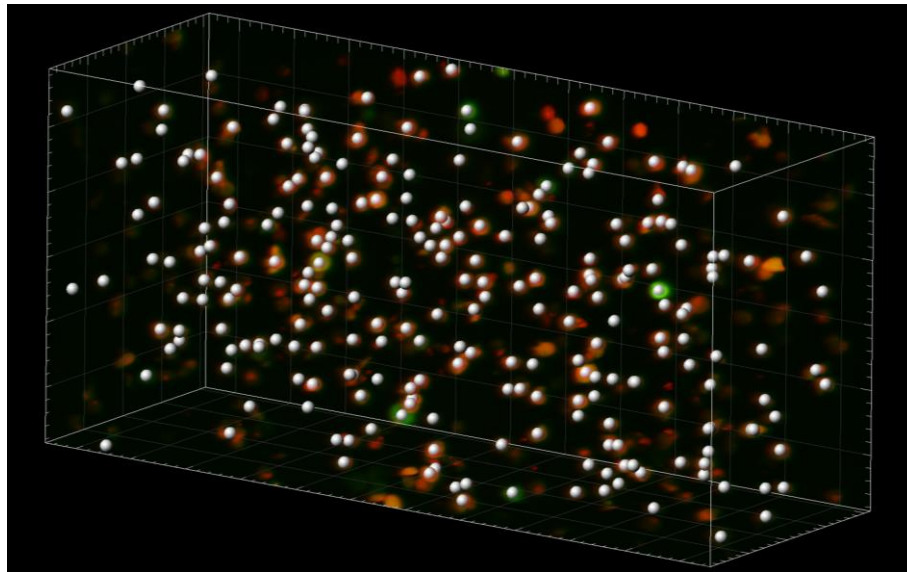


Abbildung 71: Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen können in 3D automatisiert getrackt werden.

Abb. 71 zeigt die anhand der GFP-Fluoreszenz automatisiert getrackten Zielzellen. NK-Zellen wurden durch die Objekterkennung im GFP-Kanals ausgeschlossen. Jede ROI hat einen Durchmesser von 8 μm und folgt bei Bewegung dem Zellmittelpunkt. Zielzellen an Grenzflächen des Aufnahmevolument wurden manuell entfernt. Die Fluoreszenzen der Zielzellen wurden ausgelesen. Anhand der RFP- sowie Donor Ratio-Grenzwerte wurde in Abb. 72 definiert, auf welche Art die Zielzellen abgetötet wurden (apoptotisch, nekrotisch, Nekrose mit Caspaseaktivität bzw. Sekundärnekrose, lebend).

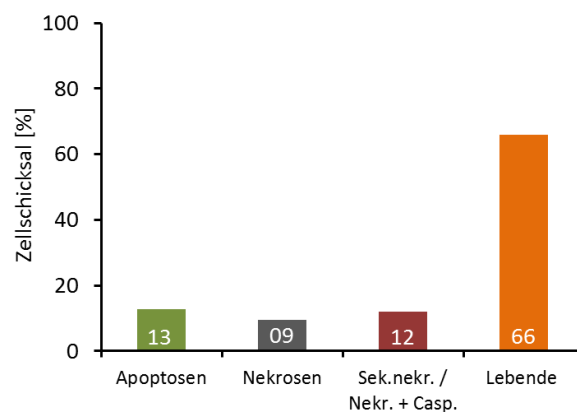


Abbildung 72: Nach dem 3D-Tracking sind die Vitalitätsentwicklungen der Zielzellen quantifizierbar.

Insgesamt wurde die Viabilität von 244 Zielzellen ausgewertet. Bei 31 Zellen (12,7 %) unterschritt das Donor Ratio den Grenzwert von 0,7, sie wurden apoptotisch. 23 Zellen (9,4 %) wurden nekrotisch, ihr F/F0 normalisiertes RFP-Signal unterschritt den Grenzwert von 0,7. Bei 29 (11,9 %) Zellen unterschritt sowohl das RFP-Signal als auch das Donor-Ratio den Grenzwert, sie wurden sekundärnekrotisch bzw. nekrotisch mit Caspaseaktivität. 161 Zellen (66 %) blieben vital.

Abb. 72 zeigt, dass das Zelltracking erfolgreich war und das Schicksal einzelner Zielzellen für eine große Population automatisiert bestimmt werden kann. Die Bewertung des Endzustandes ist jedoch nur ein Bruchteil der gewinnbaren Information. Um die Dynamik abgetöteter Zielzellen zu visualisieren, wurde für 18 repräsentative Zellen das Donor Ratio gegen das RFP-Signal geplottet (Abb. 73).

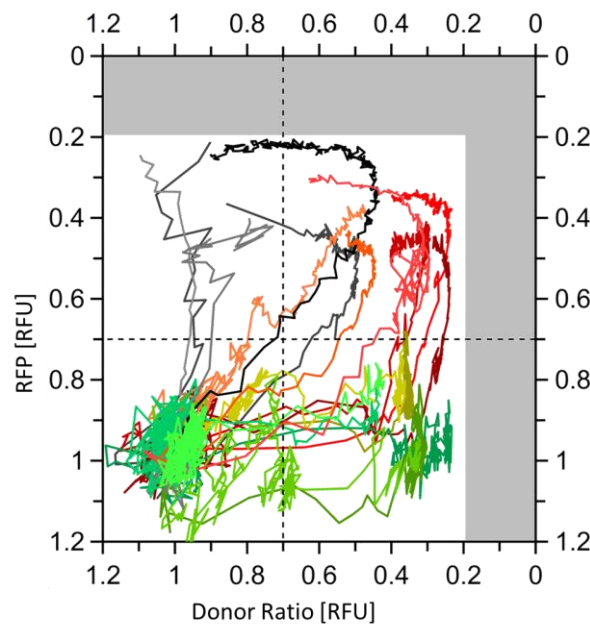


Abbildung 73: Die zytotoxischen Mechanismen automatisiert getrackter Zielzellen können im DR vs. RFP-Plot visualisiert werden.

Die Zellschicksale von 18 repräsentativen Zellen wurden geplottet. Die Plots wurden entsprechend ihres Endpunktes koloriert. Nekrotische Zellen wurden grau bis schwarz, apoptotische Zellen grün dargestellt. Zellen, die sekundärnekrotisch oder durch Nekrose mit Caspaseaktivität starben, wurden in rot bis orange dargestellt.

(Abb. 73) Im vitalen Zustand oszilliert das Signal der Zellen um $1/1 \pm 0,2$. Wird die Zelle nekrotisch, bewegt sich der Plot in den Quadranten 1/0. Die zeitlich schnelle Dynamik der Nekrosen spiegelt sich im vergleichsweise gering oszillierenden Verlauf der Plots wider (hellgraue Plots). Auffällig ist, dass Nekrosen mit Caspaseaktivität, deren Plot zunächst in den Bereich 0/0 einwandert, nach Diffusion der Fluophore ebenfalls im Quadranten 1/0 enden (dunkelgrauer und schwarzer Plot). Apoptotische Zellen bewegen sich in den Quadranten 0/1 und bilden dort im apoptotischen Zustand einen oszillierenden Endpunkt (grüne Plots). Zellen, die zunächst apoptotisch sind und dann zur Sekundärnekrose übergehen, wandern aus dem Quadranten 0/1 in den Quadranten

0/0 ein. Auch hier bewegen sich die Plots bei Ausdiffusion der Fluophore in Richtung des Quadranten 1/0.

Zusätzlich zu den aus 2D Experimenten bekannten Dynamiken zeigt die zweidimensionale Darstellung der Zellen in der 3D Kollagenmatrix zwei Auffälligkeiten. Zum einen wandern sekundärnekrotische Zellen nahezu ohne Verzögerung aus dem apoptotischen Quadranten in den Sekundärnekrotischen. Im Unterschied zu rein apoptotischen Zellen verweilen sie nicht im geschrumpften, caspaseaktiven Zustand, sondern während der zellinternen Caspaseaktivität scheint parallel die Membran zerstört zu werden. Zum anderen bewegen sich sekundärnekrotische Zellen in ihrer Endphase im Donor Ratio aus dem Quadranten 0/0 wieder in Richtung 1/0. Grund für die rückläufigen Werte des Donor-Ratio ist die verbesserte Detektion der Casper3-GR Fluoreszenz im Z.1 Lightsheet. Bei sekundärnekrotischer Ausdiffusion wird sowohl das Donor- als auch FRET-Signal sensibler detektiert, sodass bei der Annäherung beider Werte an den Hintergrund das Ratio wieder gegen 1 strebt.

Die Experimente zeigen, dass der Assay erfolgreich in einer 3D Kollagenmatrix etabliert wurde. Sowohl NK- als auch Zielzellen sind über mehrere Stunden vital und zeigen die bei Zytotoxizität etablierten Fluoreszenz- und Morphologiemerkmale. Die Fluoreszenz der Zielzellen konnte automatisiert ausgelesen werden. Obwohl die Zellen eine Stunde vor Experimentbeginn in der flüssigen Kollagenmatrix mit Killerzellen zusammengegeben werden und während der Aushärtungsphase des Gels die NK-Zellen zytotoxisch aktiv sind, ist bei Experimentbeginn der überwiegende Anteil der Zielzellen vital und die Zytotoxizität der NK-Zellen kann analysiert werden.

6 Diskussion

6.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Die Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 ist in der Forschung allgemein etabliert, verändert die Zellen jedoch (Naume, Gately, and Espevik 1992). Sie differenzieren zu zytotoxisch aktivierten Zellen. Werden NK-Zellen IL-2 stimuliert, werden die Versuchsergebnisse stets vor diesem Hintergrund bewertet. Die Untersuchung der Sequenzabfolge der Zytotoxizität wurde bewusst mit nicht stimulierten NK-Zellen durchgeführt.

Als Zielzellen wurden monoklonale Krebszelllinien eingesetzt. Aufgrund veränderter Genexpression von Krebszelllinien kann der Rückschluss auf das native, humane System angezweifelt werden. Vorteilhaft ist, dass alle Zellen dieser monoklonalen Linien als Zielzellen erkannt werden und somit die einzelzellübergreifende Analyse des zytotoxischen NK-Verhaltens ermöglichen. Würde eine inhomogene Zielzellpopulation eingesetzt, könnte unterschiedliches Verhalten zwischen einzelnen NK-Zellen nicht miteinander verglichen werden, da unbekannte und inhomogene Faktoren auf der Zielzelleseite bestünden.

Neben dem Fas-Ligand ist TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ebenfalls in der Lage rezeptorbasierte Zytotoxizität zu vermitteln. Er bindet an die Rezeptoren DR4 und DR5 (Pan, Ni, et al. 1997; Pan, O'Rourke, et al. 1997). TRAIL wird von NK-Zellen konstitutiv exprimiert (Guicciardi and Gores 2009). TRAIL wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da Literaturergebnisse zeigen, dass die Koinkubation von TRAIL und Jurkat E6-1 keinen Effekt hat (Zhang et al. 2013) und K562 ebenfalls resistent gegen TRAIL-induzierte Apoptosen sind (Hietakangas et al. 2003). Weiterhin ergab die kombinierte Inkubation von CMA und FasL-Antikörper (Abb. 64), dass die Veränderung des vesikulären pH sowie der Block des Fas-Liganden genügt, um die Zytotoxizität der NK gegen Jurkat E6-1 vollständig zu eliminieren.

Die genaue Position der Insertion des Casper3-GR Konstruktes nach transienter Transfektion ist unbekannt. Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zwischen Zellen der monoklonalen Linie können zwar durch unterschiedliche Zellzykluszustände erklärt werden, die epigenetische Expressionskontrolle des Konstrukts ist jedoch unbekannt. Da die enzymatische Funktion des Sensors hinreichend kontrolliert wurde und er wei-

terhin ratiometrisch und somit intensitätsunabhängig ausgelesen wird, ergibt sich keine Notwendigkeit die Expressionsregulation des Casper3-GR genauer zu untersuchen.

Werden 2D-Messungen ausgewertet, können die Zellen nicht automatisiert getrackt werden, da bei angrenzenden oder sich während der Migration kreuzenden Zellen ein fehlerfreies Tracking nicht möglich ist. Bei Korrekturen und manuellem Tracking muss die ROI von Hand der Bewegung des Zellmittelpunktes nachgeführt werden. Dies kann Stufenartefakte verursachen. Fluoreszenzinformationen, die aus manuell getrackten Zellen stammen, wurden daher gepoolt und gemittelt um statistische Aussagen zu ermöglichen und Artefakte zu minimieren.

Das Verhalten der NK-Zellen bei gleichzeitigem Kontakt zu mehreren Zielzellen wurde möglichst objektiv, dennoch visuell erhoben. Eine Möglichkeit der Quantifizierung wäre die Definition von ROI-Arealen in den Bereichen der Synapsen. Da jedoch auch der Bereich und die Form der Synapse bei lebenden, migrierenden Zellen einer Dynamik unterliegt, müssten auch diese Areale subjektiv nachkorrigiert werden.

Aufgrund experimenteller Limitierungen war es nicht möglich, einzelne Vesikel in ausreichender räumlicher und zeitlicher Auflösung zu mikroskopieren, sodass sie getrackt und ihre Exozytose zweifelsfrei bestimmt werden könnten. Die Vesikel wurden daher als Gruppe getrackt. Um Objektivität zu gewährleisten wurde in den Daten intensiv nach einzeln agierenden Vesikeln, die vom festgestellten Gruppenverhalten abweichen, gesucht. Zwar wurden einzelne Vesikel festgestellt, jedoch wurden sie entweder in die Gruppe reintegriert oder waren stationär und nach dem Abtöten der Zielzelle weiterhin detektierbar. Es handelte sich demnach um Vesikel, die nach kurzzeitigem Austritt wieder in die Gruppe integriert wurden oder keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zelle hatten.

Die Untersuchung der Sequenzabfolge des Abtötens der Zielzellen wurde mit unstimulierten NK-Zellen durchgeführt, um ein möglichst physiologisches Bild zu generieren. Während der achtstündigen Experimente starben einige NK-Zellen. Es wäre möglich, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt. Auslöser könnte die Beeinträchtigung der NK-Zellen durch Experimentbedingungen sein. Der wahrscheinlichste Faktor ist das Färben der Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst. Durch diesen Vorgang ist die Beeinflussung der Genexpression der NK-Zellen zu erwarten. Es ist jedoch

fraglich, ob die Zellen innerhalb des achtstündigen Messzeitraums negativ beeinflusst werden. Um dies auszuschließen wurden für jeden Spender ungefärbte Kontrollen gemessen und getrennt ausgewertet. Der Vergleich gefärbter und ungefärbter Populationen ergab keinen Unterschied in der Viabilität oder dem Abtötungsverhalten. Alle verfügbaren Zellen wurden daraufhin zur Auswertung gepoolt. Weiterhin waren einige NK-Zellen und Zielzellen, die keinen Kontakt zu NK-Zellen hatten, über den gesamten Messzeitraum hinweg vital. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Inkubationsbedingungen im Mikroskop ausreichten, um die Viabilität der Zellen über mindestens 8 h hinweg zu erhalten.

Physiologischer Hintergrund des Effektes könnte sein, dass das von den NK-Zellen während der Nekrose ausgestoßene Perforin die Vitalität der NK-Zelle beeinflusst. Zum einen könnte die Exozytose der Vesikel den Energiehaushalt der NK-Zelle beeinträchtigen, zum anderen könnte das von ihr selbst ausgestoßene Perforin ebenfalls Löcher in der ihrer eigenen Membran verursachen. Bislang ist unklar, wie sich die NK-Zelle vor der Selbstlyse schützt. Es ist denkbar, dass sie einen potenten Membranreparaturmechanismus besitzt, so dass höhere Perforinkonzentrationen als von Zielzellen toleriert werden können. Andererseits könnte sie über bislang unbekannte Mechanismen verfügen, die ihr eigenes Perforin lokal begrenzt an der NK-Membran inaktivieren, bevor dieses Poren erzeugt. Wahrscheinlich ist, dass beide Schutzoptionen einen erhöhten Energieaufwand bei Nekrosen im Vergleich zu Apoptosen erfordern. Dies würde die kürzere Lebensdauer nekrotischer Killer im Vergleich zu apoptotischen erklären. Um das Potential des Membranreparaturmechanismus der NK-Zellen zu kontrollieren, könnte der kellerzellefreie Assay genutzt werden. Besitzen NK-Zellen ein erhöhtes Reparaturpotential, sollten sie im Vergleich zu Zielzellen bei höheren Perforinkonzentrationen lysieren.

Als Schutzmechanismus wäre denkbar, dass NK-Zellen an ihrer eigenen Membran einen lokal begrenzten Bereich mit niedrigem pH generieren. Ist dies der genutzte Mechanismus, könnten spezifische Inhibitoren der Protonenpumpe der Plasmamembran (PPI) eingesetzt werden. Nach Einsatz des Blockers sollten sie nicht mehr in der Lage sein sich zu schützen und bei Exozytose perforinbeladener Vesikel ebenfalls lysieren.

Um die Art des ausgelösten Zielzelltodes mit dem Verhalten der NK-Zelle zu korrelieren, wäre es optimal die Anzahl freigesetzter Vesikel zu kennen. Die Anzahl der Vesikel zur Nekroseinduktion könnte bestimmt werden und es könnte analysiert werden, ob die Perforinkonzentration zwischen den Vesikeln variiert. Das Ziel einzelne Vesikel in ausreichender Orts- und Zeitauflösung zu erfassen, wurde nicht erreicht. Die zur Analyse der Vesikelbewegung erhobenen Daten wurden bei 20 °C gefertigt. Weiterhin mussten die Daten manuell nachsortiert werden. Die Analyse der vorhandenen Daten verdeutlicht dennoch das Geschwindigkeitspotential der Vesikel. Die Datenlage kann wahrscheinlich durch Einsatz der Lightsheetmikroskopie verbessert werden. Das System arbeitet grundsätzlich schneller und erzeugt weniger Phototoxizität als herkömmliche Weitfeldmikroskope. Weiterhin ist die Auflösung isotropisch, Vesikel würden entsprechend nicht in z-Richtung verzerrt aufgenommen, was die Möglichkeiten der Datenaufbereitung durch Dekonvolution verbessert.

Um die Perforin- und Granzymkonzentrationen mit der Dynamik ausgelöster Apoptosen und Nekrosen zu korrelieren, wurde ein killerzellfreier Assay etabliert. Bei der perforinfreien Applikation einer hohen Granzym B-Konzentration wurde eine geringe Anzahl Apoptosen ausgelöst. Es könnte sich dabei um ein Artefakt durch ungewollte Kalzium-Phosphat-Granzym B-Präzipitation handeln. Die Kalzium-Phosphat-Präzipitation wird generell zur transienten Transfektion durch Bildung von Kalzium-Phosphat-DNA Mischkristallen mit anschließender Endozytose eingesetzt (Jordan et al. 1996). Perforin benötigt zur Membrananlagerung eine Kalziummindestkonzentration von 0,1 mM (I. Voskoboinik et al. 2005). Die Kalziumzugabe im Versuch erfolgte gemäß Herstellerangaben mit 2,5 mM bei einer Endkonzentration von 1,25 mM (Enzo Life Sciences 2015b). Die Wahrscheinlichkeit ungewollter Kalziumpräzipitation könnte durch Senken der Kalziumkonzentration im Puffer minimiert werden.

Im 2D-Plot zur Analyse apoptotischer und nekrotischer Anteile des Zielzelltodes wurden zwei exemplarische Populationen untersucht, deren Pufferlösung 0 mM sowie 1 mM Kalzium enthielt. Die Auswirkung des nominell kalziumfreien Puffers auf das zytotoxische Verhalten der NK-Zellen ist extrem, da die Perforinwirkung inhibiert wird (I. Voskoboinik et al. 2005). Um den Nachweis zu erbringen, dass eine sich graduell verändernde, extrazelluläre Kalziumkonzentration auf das zytotoxische Verhalten der

NK-Zellen auswirkt, muss in Experimenten die Kalziumkonzentration kontinuierlich von 0,1 mM bis 1 mM verändert werden. In der Analyse der Ergebnisse kann anschließend untersucht werden, ob sich Anteile nicht-immunreaktiver Apoptosen sowie immunreaktiver Nekrosen verschieben. Die gewählten Datensätze zeigen jedoch klar, dass der etablierte 2D-Plot sowohl den Apoptose- als auch Nekroseanteil des Zelltodes auf Einzelzellebene visualisiert. Eine Verbesserung der Darstellung wäre die farbliche Zeitkodierung der Graphen, sodass diese die Geschwindigkeit der ablaufenden Prozesse widerspiegeln.

Die Inkubation der NK-Zellen mit CD178 Antikörper und / oder CMA zeigt, dass apoptotisches bzw. nekrotisches Abtöten von Zielzellen gezielt ausgeschaltet werden kann. Zur statistischen Verifikation müssen weitere Experimente mit anti-CD178 Antikörper inkubierten NK durchgeführt werden. Weiterhin erfasst der real-time Killingassay methodisch keine Apoptosen, sondern Sekundärnekrosen, da er den Calceinfluoreszenzverlust quantifiziert. Apoptotische Zellen werden somit zeitverzögert erfasst, sobald sie lysieren. Erfahrungsgemäß verursacht dies eine Verzögerung > 60 min. Da dieser Fehler in allen real-time Killingassays identisch ist, können sie untereinander verglichen werden. Das in Abb. 63 und Abb. 64 ab 60 min einsetzende, rezeptorbasierte Killing beginnt wahrscheinlich jedoch früher. Um dies zu überprüfen müsste die Zytotoxizität bildbasiert, oder ein Assay mit Apoptose- und Nekrosemarkern (Annexin / PI) durchgeführt werden.

Um den Assay der menschlichen Physiologie näher zu bringen, wäre neben dem 3D in vitro Modell die Etablierung eines Mausmodells denkbar. Der Vorteil bestünde darin, dass alle beobachteten Vorgänge in einer physiologischen Umgebung unter Kooperation des nativen Immunsystems stattfänden. Gleichzeitig wäre es dadurch schwieriger die Umgebungsvariablen zu kontrollieren und die Beobachtungen zu interpretieren. Zwischen NK-Zellen von Maus und Mensch bestehen weiterhin vielzählige Unterschiede in der Rezeptorexpression sowie Signaltransduktion (Inngjerdigen et al. 2011) so dass der Gewinn nativer Umgebung und kooperativem Verhaltens übriger Immunzellen mit Abstrichen in der Vergleichbarkeit zum humanen System und der Interpretierbarkeit der Ergebnisse bezahlt würden.

In der Analyse der Fluoreszenzdaten des 3D-Modells laufen Graphen in ihrer Endphase aus dem Quadranten 0/0 in Richtung 1/0. Rein dogmatisch würde diese Entwicklung bedeuten, dass das Donor Ratio und damit die Apoptose rückläufig ist. Dies ist unmöglich und eindeutig ein Artefakt. Ausgelöst wird es durch die GFP- sowie FRET-Fluoreszenzwerte, die sich bei Ausdiffusion dem Hintergrund annähern. Da die Werte beider Kanäle nah dem Hintergrund sind, sinkt der Unterschied zwischen ihnen und das Donor Ratio steigt an. Der Effekt ist in den 2D-Daten ebenfalls vorhanden, siehe Abb. 26 und Abb. 27. Bei Nekrosen steigt auch hier das Donor Ratio. Um das Artefakt zu eliminieren, müssen Plots, deren Fluoreszenzwerte sich dem Hintergrund annähern, restriktiver gefiltert werden, da die Werte nicht mehr aussagekräftig sind.

6.2 Diskussion der Ergebnisse im Kontext aktueller Forschung / Ausblick

Der immunologische Stellenwert normal regulierter Zytotoxizität wird bei der Betrachtung von Krankheitsbildern, bei denen zytotoxische Mechanismen gestört sind, deutlich.

Bei der Familiären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (FHL) kommt es zu einem Defekt in einem für Perforin kodierenden Gen (Göransdotter Ericson et al. 2001; Stepp et al. 1999), oder einem für die Exozytose der Vesikel essentiellen Gen (Feldmann et al. 2003). FHL setzt im frühen Kindheitsalter ein und hat unbehandelt eine mittlere Überlebenszeit von weniger als 2 Monaten (Henter et al. 1993; Janka 1983). Die Unfähigkeit der Immunzellen erkannte Zielzellen abzutöten löst eine verstärkte Zytokinproduktion aus, wodurch T-Zellen und Makrophagen übermäßig aktiviert werden. Typische Symptome der FHL sind Fieber, Hepatosplenomegalie (gleichzeitige Vergrößerung von Leber und Milz) und Zytopenie (Verminderung der Anzahl der Zellen im Blut) (Henter et al. 2007). Bisherige Untersuchungen der Immunzellen in der Literatur wurden per FACS (Kogawa et al. 2012) oder Chromium-Release Assay (Perez et al. 1984; Schneider et al. 2002) durchgeführt. Diese Assays sind nicht zeitaufgelöst und spiegeln nicht das Verhalten der Zellen auf Einzelzelebene wider. Gleichzeitig ist die Analyse der zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle ein Index zur Klassifizierung der Schwere der Krankheit (Perez et al. 1984). Die in dieser Arbeit entwickelten Assays eignen sich aufgrund ihrer Zeit- und Einzelzellauflösung sowie der Differenzierungsmöglichkeit apoptotischer und nekrotischer Vorgänge hervorragend zur Analyse und Diagnostik FHL-veränderter NK-Zellen.

Die FHL-Grundlagenforschung stützt sich auf die Analyse von Blutproben. Die auslösenden Mutationen sind autosomal rezessiv bei einer geschätzten Häufigkeit von 1:50.000 Neugeborenen (Henter et al. 1991). Die Möglichkeit entsprechende Zellen zu analysieren ist lokal auf Kliniken begrenzt, an der FHL-Patienten behandelt werden. Als Modellsystem existieren Mauslinien mit Perforin Knockout. Die Mäuse sind grundsätzlich gesund, wenn sie in pathogenfreier Umgebung gehalten werden. Bei Virusinfektion entwickeln sie die bekannte FHL Immunopathologie und Letalität (Binder et al.

1998; Matloubian et al. 1999; Stepp et al. 1999). Der in dieser Arbeit entwickelte Assay bietet das Potential ein humanes in vitro FHL-Modell zu generieren, indem K562 Zielzellen und CMA-inkubierte NK-Zellen eingesetzt werden. K562 sind grundsätzlich Fas defizient und verhindern dadurch die rezeptorbasierte Zytotoxizität. Die CMA Inkubation verändert den pH der Vesikel und verhindert die perforinabhängige Zytotoxizität. Bilden CMA-inkubierte NK-Zellen Synapsen mit K562, so erkennen sie die Zielzelle, können sie aber nicht umbringen. Dies sollte zu vermehrter Zytokinausschüttung und in Folge übermäßiger Aktivierung übriger Immunzellen führen. Diese Vermutung muss zunächst per ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestätigt werden. Werden erhöhte Zytokinkonzentrationen verifiziert, könnte ein 3D-Assay etabliert werden, in dem neben den NK-Zellen weitere Zellpopulationen des gleichen Spenders (Monozyten, T-Zellen etc.) auf ihr verändertes Verhalten durch übermäßige Zytokinausschüttung analysiert werden.

Der Fas-Rezeptor CD95, exprimiert auf aktivierten Lymphozyten, Leber und Herz, dient der Immunregulation und zellulären Homöostase. Mutationen des CD95 lösen Autoimmunerkrankungen aus. Die Mutationen wurden erstmalig in Mauslinien entdeckt (Andrews et al. 1978) und im Menschen bestätigt (Straus et al. 2001). Die Mäuse erkranken an Lymphadenopathie (Schwellung der Lymphknoten), Nephritis (Entzündung der Niere) und Arthritis (Entzündung der Gelenke) (Nagata and Golstein 1995; Nagata and Suda 1995). Neben dem Fas-Rezeptor kann ebenfalls eine Mutation des Fas-Liganden CD178 vorliegen (Magerus-Chatinet et al. 2013). Im Menschen wird das durch heterozygote Mutation ausgelöste Krankheitsbild als Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) bezeichnet. Es führt zur übermäßigen Vermehrung von Lymphozyten und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit maligner Lymphome (Sharma et al. 2000). Das ALPS Krankheitsbild zeigt, welchen Einfluss die rezeptorbasierte Zytotoxizität auf die Vitalität des gesamten Organismus hat. Im Vergleich zur Perforindefizienz (FHL) ist die Fas-Insuffizienz (ALPS) weniger lebensbedrohlich, dennoch verdeutlicht sie die Notwendigkeit rezeptorbasierter Zytotoxizität. Analog zur FHL-Diagnostik eignen sich die in dieser Arbeit entwickelten Assays ebenfalls zur ALPS-Diagnostik. Killerzellen der CD178 insuffizienten ALPS-Patienten könnten mit CMA inkubiert und die rezeptorvermittelte Zytotoxizität auf Einzelzellebene untersucht werden.

Betrachtet man das zytotoxische Repertoire der NK-Zellen, stellt sich die Frage was die jeweiligen Vor- und Nachteile beider Mechanismen sind.

Wie die Symptome der FHL zeigen, ist der Wegfall vesikelvermittelter Zytotoxizität lebensbedrohlich. Eine effektive Immunabwehr ist nicht mehr gewährleistet und Infektionen verlaufen letal. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass Nekrosen wesentlich schneller sind als Apoptosen (Abb. 39). NK-Zellen können durch Nekrose in kürzerer Zeit mehr infizierte Zielzellen abtöten als durch Apoptose und hemmen durch diese schnelle Komponente die Ausbreitung des Pathogens frühzeitig. Weiterhin können sämtliche Zielzelltypen nekrotisch lysiert werden, da die Nekrose nicht auf das Vorhandensein eines Zielzellrezeptors angewiesen ist, sondern Perforin die Membran der Zielzelle zerstört. Das Freisetzen zytosolischer Stoffe fördert das kooperative Verhalten übriger Immunzellen (Kono and Rock 2008; Majno, La Gattuta, and Thompson 1960). Die Nachteile der Nekrosen bestehen darin, dass im Zytosol der Zielzelle befindliche Pathogene freigesetzt werden und sie ausschließlich sequenziell ausgelöst werden können.

Die Apoptose erscheint im Gegensatz zur Nekrose geordneter. Sie führt zur Selbstverdauung der Zielzelle, wodurch ebenfalls in ihr befindliche Pathogene zerstört werden. Die apoptotische Zelle kann von Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden. Der Prozess wirkt nicht immunaktivierend und kann bei Kontakt zu mehreren Zielzellen parallel ablaufen. Ein Nachteil der Apoptose ist, dass er auf die Aktivierung der Caspasekaskade auf der Zielzelleseite angewiesen ist. Fehlt der initiiierende Rezeptor oder die Initiatorcaspase (ALPS Typ II, Defekt der Caspase 10) kann die Apoptose der Zielzelle nicht ausgelöst werden. Ein zweiter Nachteil ist der gegenüber der Nekrose erhöhte Zeitaufwand, sodass die NK-Zelle länger an der Zielzelle gebunden ist.

Durch ihre jeweiligen Vor- und Nachteile ergänzen sich beide Mechanismen. Es ist wahrscheinlich, dass die NK-Zelle bei Zielzellkontakt stets versucht sowohl die vesikel- als auch rezeptorbasierte Zytotoxizität einzusetzen. Da die vesikelbasierte wesentlich schneller abläuft wirkt sie zuerst. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis die ausgestoßene Perforinkonzentration sublytisch wird oder der Pool verfügbarer zytotoxischer Vesikel aufgebraucht ist. Durch das Aussetzen perforinvermittelter Nekrosen wird die Granzym-B oder rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion demaskiert. Dieser aus den

Ergebnissen dieser Arbeit postulierte Mechanismus erklärt sowohl, warum moduswechselnde NK-Zellen zunächst Nekrosen und erst in Folge Apoptosen auslösen (Abb. 45C), als auch, warum der Zielzelltod ein dynamisches Verhältnis apoptotischer und nekrotischer Vorgänge ist (Abb. 60).

Die Analyse der Effizienz der gefundenen Abtötungsmuster (Abb. 44) bestätigt, dass die moduswechselnden NK-Zellen die Vorteile beider Mechanismen vereinen und die effizientesten Killer sind. Diese Feststellung wirft die Frage auf, warum NK-Zellen sich unterschiedlich verhalten und warum nicht alle das effizienteste Abtötungsverhalten zeigen. Es ist bekannt, dass NK-Subpopulationen mit unterschiedlichem Zytotoxizitätspotential existieren. Sie werden eingeteilt in CD56^{dim} und CD56^{bright} (Punt, Owen, and Caligiuri 2001). Ungefähr 90 % der NK-Zellen des peripheren Blutes sind CD56^{dim}, sie exprimieren Perforin und sind zytotoxisch. NK-Zellen, die CD56^{bright} sind, besitzen hingegen kein Perforin (Anfossi et al. 2006). Ihre Aufgabe ist die Zytokinproduktion (Cooper et al. 2011). Interessanterweise zeigt die Analyse der Sequenzabfolge (Abb. 41), dass 84,9 % der NK-Zellen in der Lage waren, Nekrosen auszulösen. Es kann daher spekuliert werden, dass die nekroseauslösenden NK-Zellen CD56^{dim} waren, die rein apoptoseauslösenden CD56^{bright}. Um dies zu verifizieren, könnten Lebendzellnahmen auf Einzelzelebene mit einem Immunfluoreszenzstaining kombiniert werden. Nach der Identifikation des zytotoxischen Verhaltensmusters der NK könnten die Zellen mittels Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit einem fluoreszenzgelabelten CD56 Antikörper inkubiert werden, ohne sie aus dem Mikroskop zu nehmen. Nach Inkubation könnte die CD56-Fluoreszenz ermittelt und mit dem zuvor festgestellten Zytotoxizitätsverhalten korreliert werden. Es wäre denkbar, dass die CD56-Fluoreszenz mit den sequenziellen Abtötungsmodi übereinstimmt und rein apoptoseauslösende NK-Zellen CD56^{bright} sind, moduswechselnde NK-Zellen eine mittlere CD56 Fluoreszenz zeigen und rein nekroseauslösende NK-Zellen CD56^{dim} sind.

Wie in den kombinierten 2D-3D Messungen festgestellt wurde, erfolgt vesikelbasiertes Abtöten rein sequenziell, rezeptorbasiertes hingegen kann parallel stattfinden.

Um das parallele Abtöten der Zielzellen zu untersuchen, müsste der Fas-Ligand CD178 fluoreszent markiert und seine Verteilung während des gleichzeitigen Kontakts zu

mehreren Zielzellen analysiert werden. Zwar wurde in der Literatur die CD178 Lokalisation durch Immunofluoreszenz bereits untersucht, jedoch wurde nur der Kontakt zu einer Zielzelle analysiert und die Zelle weiterhin zum Zeitpunkt der Synapsenbildung fixiert. Das Experiment ergab, dass der FasL in menschlichen T-Zellen beim Kontakt zur Zielzelle an der Synapse akkumuliert (Voss et al. 2008). Damit ist jedoch keine Aussage über die Verteilung bei gleichzeitigem Kontakt zu mehreren Zellen getroffen. Um die Dynamik der CD178 Verteilung zu erfassen, wäre es zum einen möglich die Zelle während des Kontaktes zu mehreren Zielzellen zu fixieren und via fluoreszenzgekoppeltem Antikörper zu markieren, zum anderen könnte ein Fas-Ligand / Fluoreszenzprotein-Fusionskonstrukt kloniert und nach viraler Transfektion transient in den NK-Zellen zur Expression gebracht werden. Mit diesem Konstrukt wäre es möglich, die Dynamik der CD178-Verteilung während des Abtötens von Zielzellen zu erfassen. Es ist zu erwarten, dass bei gleichzeitiger Bindung mehrerer Zielzellen Fas-Ligand-Fluoreszenzcluster an jeder Bindestelle auftreten.

Die Regulation der sequenziellen, vesikelvermittelten Zytotoxizität wird durch die intrazelluläre Koordination der Vesikel bestimmt. Das Verständnis dieses Prozesses ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Reorganisation des Zytoskeletts und Relokalisation des Microtubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) zur immunologischen Synapse (IS) sind Prozesse, die vielfach beobachtet wurden und in der Literatur als Kennzeichen der Immunzellaktivierung etabliert sind (Billadeau, Nolz, and Gomez 2007). Nach aktuellem Verständnis führt das Erkennen der Zielzelle dazu, dass F-Actin polymerisiert, die Immunzelle polarisiert und eine IS bildet (Čemerski and Shaw 2006; Cullinan, Sperling, and Burkhardt 2002). Der Kontaktstellenbereich wird als peripherer und zentraler supramolekularer Adhäsionskomplex (pSMAC und cSMAC) bezeichnet (Varma et al. 2006). Das aktuelle Modell sieht vor, dass das Dynein das MTOC durch Zug an den Mikrotubuli zur IS relokalisiert (Combs et al. 2006). Die MTOC-Bewegung wird generiert, indem das Adhäsions- und Degranulationsadapterprotein (ADAP) im Bereich des pSMAC bindet, die Mikrotubuli mit dem Plus-Ende am Zytoskelett verankert sind und Dynein Zug auf die Mikrotubuli ausübt (Stinchcombe et al. 2006). Das MTOC wird dadurch in unmittelbare Nähe der IS gezogen. Die Vesikel wandern in minus-Richtung entlang den Mikrotubuli, von wo aus sie zur Sekretion an der IS entsandt werden (Billadeau, Nolz, and Gomez 2007). Der Prozess der IS-Bildung wurde sowohl in CD8⁺ T- als auch NK-

Zellen untersucht. Zwischen den Zelltypen bestehen Unterschiede in den aktivierenden Rezeptoren, die Notwendigkeit der Relokalisation des MTOC zur Exozytose von Vesikeln ist hingegen für beide Typen essentiell (Davis and Dustin 2004; Van der Merwe 2002). Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen in Einklang mit dem in der Literatur postulierten Modell. Es wurde beobachtet, dass die Vesikel als Gruppe gemeinsam und sequenziell von Zielzelle zu Zielzelle transloziert werden (Abb. 31 bis Abb. 36). Da die Mikrotubuli das MTOC als zentralen Verbindungspunkt bewegen und die Vesikel zum MTOC wandern, bewegen sie sich als Gruppe von IS zu IS. Es ist zu beachten, dass die Aufnahmen dieser Arbeit ausschließlich die Lokalisation der Vesikel zeigen. Um verlässliche Aussagen über die Bewegung des MTOC in Relation zu den Vesikeln zu treffen, müsste das MTOC ebenfalls fluoreszenzmarkiert und dessen Dynamik parallel zu den Vesikeln detektiert werden.

Die Etablierung des Assays in der 3D-Matrix bietet die Möglichkeit, physiologisch relevante Szenarien kontrolliert nachzubilden und mögliche Veränderungen des Zytotoxizitätsverhaltens der Immunzellen zu analysieren. Beispielsweise könnten Fieber- und Unterkühlungszustände nachgestellt werden. Nach Klassifizierung des Verhaltens der NK-Zellen in der 3D Matrix bei 37 °C könnten Versuche bei 34 bzw. 40 °C durchgeführt und das zytotoxische Verhalten verglichen werden. Da die Apoptose hauptsächlich rezeptorvermittelt, die Nekrose jedoch durch Exozytose von Vesikeln ausgelöst wird, ist es möglich, dass Temperaturvariationen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Mechanismen ausüben. Es ist denkbar, dass die Erhöhung der Umgebungstemperatur die Induktion von Nekrosen begünstigt, so dass neben der durch die Temperatur erhöhten Geschwindigkeit aller Prozesse ebenfalls eine erhöhte kooperative Wirkung übriger Immunzellen provoziert wird.

Um die Wirkung unterschiedlicher Todesarten auf das Immunsystem zu analysieren, könnte die Detektion von Apoptosen und Nekrosen durch Immunzellen auf molekularer Ebene untersucht werden. Eine bekannte Rezeptorgruppe zur Detektion infektionsassoziierten Moleküle sind Formylpeptidrezeptoren (Fpr) (Bufer, Schumann, and Zufall 2012). Um unterschiedliches Signaling bei Apoptosen und Nekrosen nachzuweisen, wurde in Vortests Fpr transient in HEK-Zellen transfiziert und der Kalziumindikator Fura-2 geladen. Bei Inkubation mit nekrotischen Ansätzen zeigten die Zellen erhöhte Ak-

tivität, jedoch waren sie in den Negativkontrollen ebenfalls aktiv. Wahrscheinlicher Auslöser war, dass die Fpr-Rezeptoren nicht direkt an die signalvermittelnde Untereinheit G α 16 gekoppelt waren, sondern kotransfiziert wurden. Wahrscheinlich wurden Stimuli anderer Rezeptoren (Zellkontakt etc.) über G α 16 ebenfalls in Kalziumsignale übersetzt. Um dies in zukünftigen Experimenten zu verhindern, könnten Fusionskonstrukte der humanen Fpr-Rezeptoren mit der G α 16 Untereinheit hergestellt werden. In einer kombinierten Inkubation aus NK-Zellen, Casper3-GR transfizierten Zielzellen und Fura-2 geladenen, Fpr-G α 16 transfizierten HEK Zellen könnte die Art des Zielzelltodes mit Kalziumsignalen in der Nähe befindlicher Fpr-G α 16 transfizierter Zellen korreliert werden. Zeigen die Zellen in der Nähe von Nekrosen andere Kalziumsignale als Zellen in der Nähe von Apoptosen, wären die Fpr als inflammationsdetektierende Rezeptoren identifiziert.

Um die Kooperativität verschiedener Immunzelltypen zu untersuchen, könnten CD8⁺ T-Zellen und/oder Monozyten des gleichen Spenders gemeinsam mit NK- und Zielzellen in der 3D-Matrix mikroskopiert werden. Kalziumsignale von Monozyten, die sich in der Nähe apoptotischer oder nekrotischer Zielzellen befinden, könnten analysiert werden, sowie das Migrationsverhalten von CD8⁺ T-Zellen. Hier könnte untersucht werden, ob das Auslösen von Nekrosen durch NK-Zellen zur lokalen Akkumulation von CD8⁺ T-Zellen führt.

Ein weiterer Schritt um das 3D Modell der humanen Physiologie anzunähern ist die Generierung artifizieller Tumorsphäroide aus den stabilen Casper3-GR Zelllinien. Diese könnten gemeinsam mit NK-Zellen in die Matrix eingebettet werden. Man könnte untersuchen, ob NK-Zellen in den artifiziellen Tumor einwandern und wie dies das bekannte Zytotoxizitätsverhalten verändert. Möglicherweise passen NK-Zellen, je tiefer sie in den Tumor eindringen, ihr Verhalten den veränderten Umgebungsvariablen an (Kalziumgradient, pH, Nährstoffversorgung). Auch könnte analysiert werden, ob NK-Zellen den Tumor aus allen Raumrichtungen angreifen, oder durch Auslösen von Nekrosen Inflammationsherde definiert werden und NK-Zellen lokal akkumulieren.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen

Saul S, Stanisz H, Backes CS, Schwarz EC, Hoth M (2014). How ORAI and TRP channels interfere with each other: interaction models and examples from the immune system and the skin. *Eur J Pharmacol* 739, 49-59.

Backes CS, Mang S, Schoppmeyer R, Knörck A, Hoxha C, Schwär G, Schwarz EC, Niemeyer B, Alansary D, Hoth M, Kummerow C (2016). Natural Killer cell mediated cytotoxicity is strictly serial for necrotic killing but can be parallel for apoptotic killing (in Vorbereitung)

Lyrmann H*, Neef N*, Backes CS, Hoth M, Kruse K*, Kummerow C* (2016). Immune cell motility is optimized for target cell search (in Vorbereitung)

Zhou X*, Friedmann, K*, Lyrmann H*, Zhou Y*, Schoppmeyer R*, Backes CS, Hoxha C, Angenendt A, Bhat SS, Knörck A, Mang S, Zhao R, Cappello S, Schwär G, Mangerich C, Neef M, Kruse K, Lis A, Qu B, Kummerow C, Schwarz EC, Hoth M (2016). Efficient target cell killing by human CTL and NK cells at their respective calcium optimum (in Vorbereitung).

Pusch T, Muhammad K, Vöth M, Kummerow C, Backes CS, Schoppmeyer R, Hoth M, Klein-Hessling S, Berberich-Siebelt F, Serfling E, and Avots A (2016). NFATc1 controls the cytotoxic activity of CD8+ effector T cells. (In Vorbereitung)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das RFP-Signal kann durch $0.42 \cdot \text{GFP} + 0.58 \cdot \text{FRET}$ berechnet werden	39
Abbildung 2: 100 nM CMA bei 4 stündiger Vorinkubation verhindern die Induktion von Nekrosen durch NK-Zellen	40
Abbildung 3: Ein Tag nach Isolation hat die NK Population eine Reinheit von 98 %	43
Abbildung 4: IL-2 Stimulation führt zur Differenzierung der NK-Zellen	45
Abbildung 5: Die nach der Fluoreszenzintensität separierten Populationen der Ausgangs- und stabilen Zelllinien trennen sich in der FACS-Analyse auf.	47
Abbildung 6: Die Viabilität beider Zelllinien unter Mikroskopinkubationsbedingungen liegt bei 6 Stunden über 95 %	48
Abbildung 7: Der Casper3-GR Apoptosesensor ist populationsweit funktional in beiden stabilen Zelllinien. Jurkat E6-1 pCasper ist sensitiv für CD95-aktivierenden Antikörper, K562 pCasper nicht.	49
Abbildung 8: Kinetik der Apoptoseinduktion in beiden stabilen Zelllinien über 6 h durch Staurosporin und CD95 Antikörper Apo 1-1	49
Abbildung 9: FACS-Nachweis der CD95 Expression bei Jurkat E6-1, Jurkat E6-1 pCasper, K562 und K562 pCasper	51
Abbildung 10: Akzeptor-crosstalk und Donor-bleedthrough des tagGFP-tagRFP-FRET Paares .	52
Abbildung 11: Der Donor-bleedthrough ist geringer als der Akzeptor-crosstalk	53
Abbildung 12: Der Donor-bleedthrough beträgt 3,6 %, der Akzeptor-crosstalk 22,6 %	53
Abbildung 13: Vitale und apoptotische K562 pCasper im Overlay, FRET nach Youvan und FRET Donor Ratio	55
Abbildung 14: Der durchschnittliche Grauwert apoptotischer Zellen sinkt im FRET-Donor Ratio nahe 0	56
Abbildung 15: Das mutierte Casper3-GR mit DEVA Bindestelle wird von den Zellen exprimiert und ist fluoreszent	57
Abbildung 16: In dem mutierten Casper3-GR mit DEVA Bindestelle verändert sich das Fluoreszenzratio während der Apoptose nicht	57
Abbildung 17: Das DEVA-mutierte FRET-Konstrukt wird während der Apoptose nicht mehr gespalten	58
Abbildung 18: Während der Nekrose entsteht eine physikalische Öffnung der Zielzellmembran, durch welche Farbstoffe aus- und eindiffundieren	59
Abbildung 19: Parallel zum Calceinverlust strömt PI in die Zielzelle ein	60
Abbildung 20: Der Gradient des PI-Einstroms beginnt an der IS.	61

Abbildung 21: Die PI-Fluoreszenz der Zielzelle steigt zunächst lokal an der IS an und diffundiert von dort in die Zelle	61
Abbildung 22: Fura-2 als zytosolischer Farbstoff ist redundant zu Calcein	62
Abbildung 23: Die Kinetik des Fura-2 Fluoreszenzverlustes während der Nekrose ist vergleichbar mit Calcein.....	63
Abbildung 24: Casper3-GR zeigt bei Nekrosen ein eindeutiges Diffusionsverhalten und erlaubt die sichere Unterscheidung zu Apoptosen	64
Abbildung 25: Casper3-GR zeigt spezifische Fluoreszenzveränderungen je nach Art des Zelltodes.....	65
Abbildung 26: Während der Apoptose verschiebt sich das Fluoreszenzratio und erreicht Plateauwerte. An die Apoptose anschließend kann eine Sekundärnekrose folgen, die nicht durch Killerzellen induziert wird.	66
Abbildung 27: Während der Nekrose kann es zu einer Caspaseaktivität kommen, die im ausdiffundierenden Zytosol den FRET-Sensor schneidet und das Ratio verändert.....	68
Abbildung 28: Während der Nekrose ohne Caspaseaktivität sinkt die Fluoreszenz in allen Kanälen gleichmäßig	69
Abbildung 29: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzsignale während Apoptosen und Sekundärnekrosen	70
Abbildung 30: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzsignale während Nekrosen mit und ohne Caspaseaktivität	71
Abbildung 31: NK92 lösen vesikelabhängige Zielzelltode sequenziell aus	74
Abbildung 32: NK92 lösen Apoptosen durch Rezeptorbindung parallel zum sequenziellen Killing durch Vesikel aus	76
Abbildung 33: Bei primären NK ist das vesikelbasierte Abtöten von Zielzellen sequenziell (Bsp. 1)	78
Abbildung 34: Bei primären NK ist das vesikelbasierte Abtöten von Zielzellen sequenziell (Bsp. 2)	79
Abbildung 35: Durch Rezeptorkopplung können primäre NK-Zellen die Zielzellen parallel abtöten (Bsp. 1).....	81
Abbildung 36: Durch Rezeptorkopplung können primäre NK-Zellen die Zielzellen parallel abtöten (Bsp. 2).....	82
Abbildung 37: Im Schnitt tötet jede NK-Zelle 3,26 Zielzellen, die maximale Anzahl liegt bei 10 abgetöteten Zielzellen	84
Abbildung 38: 63 % der durch NK-Zellen induzierten Zielzelltode sind Nekrosen	85
Abbildung 39: Nekrosen laufen wesentlich schneller ab als Apoptosen	85

Abbildung 40: Im Schnitt tötet eine primäre, humane NK-Zelle 3,36 Zielzellen.....	86
Abbildung 41: NK-Zellen bevorzugen hierarchisch Nekrosen vor Apoptosen	86
Abbildung 42: NK-Zellen, die nur Nekrosen induzieren töten pro Stunde die meisten Zielzellen	87
Abbildung 43: NK-Zellen verschiedener Kategorien sind unterschiedlich lange aktiv	88
Abbildung 44: Je nach Abtötungsmuster sind NK-Zellen unterschiedlich effizient	89
Abbildung 45: Effizienzsteigerung von NK Zellen durch den Wechsel von frühen Nekrosen zu späten Apoptosen.....	90
Abbildung 46: Die Dekonvolution verbessert das Signal zu Rauschverhältnis und die Auflösung	92
Abbildung 47: Die Dekonvolution verbessert das SNR und erhöht die Auflösung	93
Abbildung 48: Nach Dekonvolution messen die Vesikel im xy-Durchmesser im Durchschnitt 264nm	93
Abbildung 49: Optimierung der Aufnahmeparameter sowie Dekonvolution der Daten ermöglicht Vesikel in 3D zu beobachten und ihre Bewegung mit dem Casper3-GR Sensor zu korrelieren.....	94
Abbildung 50: Im dekonvoluierten Datensatz können die Vesikel automatisiert erkannt und getrackt werden	95
Abbildung 51: Selektion von Tracks einzelner Vesikel	96
Abbildung 52: Die mittlere Vesikelgeschwindigkeit bei 22°C beträgt 0,04 $\mu\text{m/s}$	97
Abbildung 53: Perforin induziert Nekrosen dosisabhängig, Granzym B dringt perforinvermittelt in Zielzellen ein und induziert Apoptosen.....	99
Abbildung 54: Die Anzahl der Nekrosen durch Perforin sowie die Kinetik perforinvermittelter Apoptosen durch Granzym B ist abhängig von der Perforindosis	101
Abbildung 55: Hohe Konzentrationen an Granzym B können passiv ohne Perforinvermittlung in Zielzellen aufgenommen werden und Apoptosen auslösen.....	102
Abbildung 56: Granzym B in hoher Konzentration kann ohne Perforinvermittlung in Zielzellen eindringen und Apoptosen auslösen	103
Abbildung 57: 2D-Plot zur Klassifizierung der Dynamik des Zelltodes.....	105
Abbildung 58: NK-Zellen töten Jurkat E6-1 pCasper sowohl im 0 mM als auch 1 mM Kalziumpuffer ab.....	106
Abbildung 59: Vitale Zellen befinden sich im 2D-Plot bei $1/1 \pm 20\%$	107
Abbildung 60: In 0 mM Kalziumpuffer lösen die NK-Zellen ausschließlich Apoptosen aus, in 1 mM Kalziumpuffer zusätzlich Nekrosen sowie Zwischenformen	108

Abbildung 61: CMA inkubierte NK92 induzieren in Jurkat E6-1 pCasper ausschließlich Apoptosen.....	110
Abbildung 62: CMA-inkubierte NK-Zellen töten ausschließlich durch Apoptoseinduktion.....	111
Abbildung 63: CMA behandelte NK-Zellen töten K562 nicht, Jurkat E6-1 ausschließlich durch Apoptosen.....	113
Abbildung 64: Durch anti-CD178 Antikörper kann die Fas-vermittelte Zytotoxizität gezielt ausgeschaltet werden	114
Abbildung 65: NK-Zellen und Jurkat E6-1 pCasper sind über drei Stunden in der Kollagenmatrix vital und migrieren.....	116
Abbildung 66: NK-Zellen induzieren in der 3D Kollagenmatrix Apoptosen	117
Abbildung 67: NK-Zellen töten Jurkat E6-1 pCasper in der Kollagenmatrix durch Nekrose.....	118
Abbildung 68: Die sphärische ROI zur Bestimmung der Zielzellfluoreszenz kann automatisch generiert werden	119
Abbildung 69: Das Fluoreszenzverhalten des Casper-Sensors in der Kollagenmatrix ist analog zum Verhalten in 2D Aufnahmen.....	119
Abbildung 70: Sowohl die Apoptose als auch die Nekrose der in 3D gemessenen Zellen sind im Plot eindeutig klassifizierbar	120
Abbildung 71: Jurkat E6-1 pCasper Zielzellen können in 3D automatisiert getrackt werden.	121
Abbildung 72: Nach dem 3D-Tracking sind die Vitalitätsentwicklungen der Zielzellen quantifizierbar.....	121
Abbildung 73: Die zytotoxischen Mechanismen automatisiert getrackter Zielzellen können im DR vs. RFP-Plot visualisiert werden.....	122

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeiner Laborbedarf, allgemeine Laborgeräte	19
Tabelle 2: Zellen	19
Tabelle 3: Mikroskopzubehör und -komponenten	19
Tabelle 4: Lösungen, Kulturmedien, Farbstoffe, Probenvorbereitung, Inkubation.....	20
Tabelle 5: Antikörper, Plasmide, Primer, Molekularbiologie.....	21
Tabelle 6: qRT-PCR-Nachweis der CD95 mRNA in Jurkat E6-1 und in K562, $2^{-\Delta C_q}$ Werte.....	50
Tabelle 7: Die dreidimensionale Aufnahme schneller Prozesse in subzellulärer Auflösung stellt extreme experimentelle Anforderungen	91

7.4 Literaturverzeichnis

- AdvancedBioMatrix. 2015a. "Nutragen Collagen."
- . 2015b. "Poly-L-Ornithine."
- Albert, M L, B Sauter, and N Bhardwaj. 1998. "Dendritic Cells Acquire Antigen from Apoptotic Cells and Induce Class I-Restricted CTLs." *Nature* 392(6671): 86–89.
- Amara. 2015. "Amara ® Cell Line Nucleofector ® Kit V." *Protocol*.
- Andrews, B S et al. 1978. "Spontaneous Murine Lupus-like Syndromes. Clinical and Immunopathological Manifestations in Several Strains." *J Exp Med* 148(5): 1198–1215.
- Anfossi, Nicolas et al. 2006. "Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I." *Immunity* 25(2): 331–42.
- ATCC. 1994. "K562."
- . 2015. "Jurkat, Clone E6-1 (ATCC ® TIB-152 ™)." : 1–3.
- Aubry, Jean Pierre et al. 1999. "Annexin V Used for Measuring Apoptosis in the Early Events of Cellular Cytotoxicity." *Cytometry* 37(3): 197–204.
- Baran, Katherine et al. 2009. "The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly." *Immunity* 30(5): 684–95.
- Billadeau, Daniel D., Jeffrey C. Nolz, and Timothy S. Gomez. 2007. "Regulation of T-Cell Activation by the Cytoskeleton." *Nature Reviews Immunology* 7(2): 131–43.
- Binder, D et al. 1998. "Aplastic Anemia Rescued by Exhaustion of Cytokine-Secreting CD8+ T Cells in Persistent Infection with Lymphocytic Choriomeningitis Virus." *J Exp Med* 187(11): 1903–20.
- Bornego, Francisco, José Pena, and Rafael Solana. 1993. "Regulation of CD69 Expression on Human Natural Killer Cells: Differential Involvement of Protein Kinase C and Protein Tyrosine Bases." *European journal of immunology* 23: 1039–43.
- Brehm, Claudia et al. 2011. "IL-2 Stimulated but Not Unstimulated NK Cells Induce Selective Disappearance of Peripheral Blood Cells: Concomitant Results to a Phase I/II Study." *PLoS ONE* 6(11).
- Bufe, Bernd, Timo Schumann, and Frank Zufall. 2012. "Formyl Peptide Receptors from Immune and Vomeronasal System Exhibit Distinct Agonist Properties." *Journal of Biological Chemistry* 287(40): 33644–55.
- Caricchio, R, E a Reap, and P L Cohen. 1998. "Fas/Fas Ligand Interactions Are Involved in Ultraviolet-B-Induced Human Lymphocyte Apoptosis." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(1): 241–51.
- Čemerski, Sašo, and Andrey Shaw. 2006. "Immune Synapses in T-Cell Activation." *Current Opinion in Immunology* 18(3): 298–304.
- Clausen, Johannes et al. 2003. "Functional Significance of the Activation-Associated Receptors CD25 and CD69 on Human NK-Cells and NK-like T-Cells." *Immunobiology* 207(2): 85–93.
- Combs, J et al. 2006. "Recruitment of Dynein to the Jurkat Immunological Synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14883–88.
- Cooper, Megan a et al. 2011. "Human Natural Killer Cells : A Unique Innate Immunoregulatory Role for the CD56 Bright Subset Human Natural Killer Cells : A Unique Innate Immunoregulatory Role for the CD56 Bright Subset." 97(10): 3146–51.
- Cory, Suzanne, and Jerry M Adams. 2002. "The Bcl2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch." *Nature reviews. Cancer* 2(9): 647–56.
- Cullinan, Patrick, Anne I. Sperling, and Janis K. Burkhardt. 2002. "The Distal Pole Complex: A Novel Membrane Domain Distal to the Immunological Synapse." *Immunological Reviews* 189(1): 111–22.

- Dahlberg, Carin, and Evren Alici. 2015. "Natural Killer Cell-Based Therapies Targeting Cancer : Possible Strategies to Gain and Sustain Anti-Tumor Activity." *Frontiers in immunology* 6(November): Article 605.
- Davis, Daniel M., and Michael L. Dustin. 2004. "What Is the Importance of the Immunological Synapse?" *Trends in Immunology* 25(6): 323–27.
- Dean, A M et al. 2007. "A Common Fold Mediates Vertebrate Defense and Bacterial Attack." *Science (New York, N.Y.)* 317(September): 1548–52.
- Deng, Xuewen et al. 2012. "Synergistic Cytotoxicity of Ex Vivo Expanded Natural Killer Cells in Combination with Monoclonal Antibody Drugs against Cancer Cells." *International immunopharmacology* 14(4): 593–605.
- Duvall, E, and a.H Wyllie. 1986. "Death and the Cell." *Immunology Today* 7(4): 115–19.
- Enari, M et al. 1998. "A Caspase-Activated DNase That Degrades DNA during Apoptosis, and Its Inhibitor ICAD." *Nature* 391(6662): 43–50.
- Enzo Life Sciences. 2015a. "Granzyme B Product Data Sheet."
- . 2015b. "Perforin Product Data Sheet."
- Evrogen. 2008. "Caspase-3 Apoptosis Sensor Casper3-GR." *Company Data sheet*.
- Fang, Bin, Peter I. Boross, Jozsef Tozser, and Irene T. Weber. 2006. "Structural and Kinetic Analysis of Caspase-3 Reveals Role for S5 Binding Site in Substrate Recognition." *Journal of Molecular Biology* 360(3): 654–66.
- Feldmann, Jérôme et al. 2003. "Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3)." *Cell* 115(4): 461–73.
- Fischer, U, R U Jänicke, and K Schulze-Osthoff. 2003. "Many Cuts to Ruin: A Comprehensive Update of Caspase Substrates." *Cell death and differentiation* 10(1): 76–100.
- Förster, Th. 1948. "Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz Von T H . F O R S T E R." *Annalen der Physik* 6(2): 55–75.
- Frey, M et al. 1998. "Differential Expression and Function of L-Selectin on CD56bright and CD56dim Natural Killer Cell Subsets." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(1): 400–408.
- Froelich, Christopher J et al. 1996. "New Paradigm for Lymphocyte Granule-Mediated Cytotoxicity." *J Biol Chem* 271(46): 29073–79.
- Gerner, Christopher et al. 2000. "The Fas-Induced Apoptosis Analyzed by High Throughput Proteome Analysis." *Journal of Biological Chemistry* 275(50): 39018–26.
- Göransdotter Ericson, K et al. 2001. "Spectrum of Perforin Gene Mutations in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." *American journal of human genetics* 68(3): 590–97.
- Green, D R, and J C Reed. 1998. "Mitochondria and Apoptosis. [Review] [59 Refs]." *Science* 281(August): 1309–12.
- Guicciardi, Maria Eugenia, and Gregory J Gores. 2009. "Life and Death by Death Receptors." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(6): 1625–37.
- Hengartner, M O. 2000. "The Biochemistry of Apoptosis." *Nature* 407(6805): 770–76.
- Henter, J. I. et al. 2007. "HLH-2004: Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." *Pediatr Blood Cancer* 48: 124–31.
- Henter, J. I., A. Ehrnst, J. Andersson, and G. Elinder. 1993. "Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Viral Infections." *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 82(4): 369–72.
- Henter, J. I., G. Elinder, O. Söder, and A. Öst. 1991. "Incidence in Sweden and Clinical Features of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 80(4): 428–35.

- Hietakangas, Ville et al. 2003. "Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP." *Molecular and cellular biology* 23(4): 1278–91.
- Honda, Y, and S Miyazaki. 1996. "Distinct Ca²⁺ Response Patterns in Human Natural Killer Cells during Induction of Necrosis or Apoptosis of Target Cells." *Cell calcium* 19(4): 297–306.
- Huynh, Mai-Lan N, Valerie A Fadok, and Peter M Henson. 2002. "Phosphatidylserine-Dependent Ingestion of Apoptotic Cells Promotes TGF-beta1 Secretion and the Resolution of Inflammation." *The Journal of clinical investigation* 109(1): 41–50.
- Inngjerdingen, M, L Kveberg, C Naper, and J T Vaage. 2011. "Natural Killer Cell Subsets in Man and Rodents." *Tissue Antigens* 78: 81–88.
- Invitrogen. 1981. "Staurosporine Product Analysis Sheet." *Displays* 2(5): 220.
- . 2001. "Geneticin (G-418 Sulfate)." (2068): 11811.
- . 2007. "LysoTracker® and LysoSensor™ Probes." : 1–5.
- . 2011a. "Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators Quick Facts." : 1–6.
- . 2011b. "Recombinant Human Interleukin-2 (IL-2)." 2: 2–3.
- Janka, G. 1983. "Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." *European Journal of Pediatrics* 140(3): 221–30.
- Jordan, Martin, Annette Schallhorn, Florian M Wurm, and South San Francisco. 1996. "Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation." *Nucleic Acids Research* 24(4): 596–601.
- Kataoka, T et al. 1996. "Concanamycin A, a Powerful Tool for Characterization and Estimation of Contribution of Perforin- and Fas-Based Lytic Pathways in Cell-Mediated Cytotoxicity." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156(10): 3678–86.
- Kayagaki, Nobuhiko, Ko Okumura, and Hideo Yagita. 1995. "Metalloproteinase-Mediated Release of Human Fas Ligand." *J. Exp. Med.* 182(December): 1777–83.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie a. R. 1972. "Apoptosis : A Basic Biological Phenomenon With Wide-." *Br. J. Cancer* 26: 239–57.
- Koehl, U. et al. 2005. "Expansion of Highly Purified NK Cells for Immunotherapy after Haploidentical Stem Cell Transplantation in Children." *Klinische Pädiatrie* 217(6): 345–50.
- Kogawa, Kazuhiro et al. 2012. "Perforin Expression in Cytotoxic Lymphocytes from Patients with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Their Family Members Perforin Expression in Cytotoxic Lymphocytes from Patients with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Their Family Members." 99(1): 61–66.
- Kono, Hajime, and Kenneth L. Rock. 2008. "How Dying Cells Alert the Immune System to Danger." *Nature Reviews Immunology* 8(4): 279–89.
- Kroemer, G et al. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell death and differentiation* 16(1): 3–11.
- Krzewski, Konrad et al. 2013. "LAMP1 / CD107a Is Required for Efficient Perforin Delivery to Lytic Granules LAMP1 / CD107a Is Required for Ef Fi Cient Perforin Delivery to Lytic Granules and NK-Cell Cytotoxicity." 121(23): 4672–83.
- Krzewski, Konrad, and John E Coligan. 2012. "Human NK Cell Lytic Granules and Regulation of Their Exocytosis." *Frontiers in Immunology* 3(November): 1–16.
- Kummerow, Carsten et al. 2014. "A Simple, Economic, Time-Resolved Killing Assay." *European Journal of Immunology* 44(6): 1870–72.
- Law, Ruby H P et al. 2010. "The Structural Basis for Membrane Binding and Pore Formation by Lymphocyte Perforin." *Nature* 468(7322): 447–51.
- Lettre, Guillaume, and Michael O Hengartner. 2006. "Developmental Apoptosis in C. Elegans: A

- Complex CEDnario." *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(2): 97–108.
- Lifetechnologies. 2012. "Dynabeads Untouched Human NK Cells ®[™]." : 1–2.
- Ljunggren, Hans-Gustaf, and Karl-Johan Malmberg. 2007. "Prospects for the Use of NK Cells in Immunotherapy of Human Cancer." *Nature reviews. Immunology* 7(5): 329–39.
- Lodoen, Melissa B, and Lewis L Lanier. 2005. "Viral Modulation of NK Cell Immunity." *Nature reviews. Microbiology* 3(1): 59–69.
- Lonza. 2009. "Amixa® Human NK Cell Nucleofector® Kit." : 3–6.
- Lopez, Jamie a. et al. 2013. "Perforin Forms Transient Pores on the Target Cell Plasma Membrane to Facilitate Rapid Access of Granzymes during Killer Cell Attack." *Blood* 121(14): 2659–68.
- Lüthi, a U, and S J Martin. 2007. "The CASBAH: A Searchable Database of Caspase Substrates." *Cell death and differentiation* 14(4): 641–50.
- Magerus-Chatinet, Aude et al. 2013. "Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Caused by a Homozygous Null FAS Ligand (FASLG) Mutation." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(2): 486–90.
- Majno, G, M La Gattuta, and T E Thompson. 1960. "Cellular Death and Necrosis: Chemical, Physical and Morphologic Changes in Rat Liver." *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 333: 421–65.
- Majno, G, and I Joris. 1995. "Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death." *The American journal of pathology* 146(1): 3–15.
- Matloubian, M et al. 1999. "A Role for Perforin in Downregulating T-Cell Responses during Chronic Viral Infection." *Journal of virology* 73(3): 2527–36.
- Ménager, Mickaël M et al. 2007. "Secretory Cytotoxic Granule Maturation and Exocytosis Require the Effector Protein hMunc13-4." *Nature immunology* 8(3): 257–67.
- Mentlik James, Ashley, Adam D Cohen, and Kerry S Campbell. 2013. "Combination Immune Therapies to Enhance Anti-Tumor Responses by NK Cells." *Frontiers in immunology* 4(December): 481.
- Van der Merwe, P. Anton. 2002. "Formation and Function of the Immunological Synapse." *Current Opinion in Immunology* 14(3): 293–98.
- Munker, R. et al. 1997. "Expression of CD95(FAS) by Gene Transfer Does Not Sensitize K562 to Fas-Killing." *Hematol Cell Ther.* 39(75-8).
- Muriel Hachet-Haas, Noel Converset, Olivier Marchal, Hans Matthes, Sophie Gioria, Jean-Luc Galzi, Sandra Lecat. 2006. "FRET and Colocalization Analyzer." *ImageJ website*.
- Murphy, Kenneth P. 2011. *Immunobiology*. 8th ed. Garland Science.
- Nagata, S, and P Golstein. 1995. "The Fas Death Factor." *Science (New York, N.Y.)* 267(5203): 1449–56.
- Nagata, S., and T. Suda. 1995. "Fas and Fas Ligand: Ipr and Gld Mutations." *Immunology Today* 16(1): 39–43.
- Naume, B, M Gately, and T Espevik. 1992. "A Comparative Study of IL-12 (cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor)-, IL-2-, and IL-7-Induced Effects on Immunomagnetically Purified CD56+ NK Cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148(8): 2429–36.
- Orange, Jordan S. 2002. "Forum in Immunology Human Natural Killer Cell Deficiencies and Susceptibility to Infection." 4: 1545–58.
- . 2009. "Formation and Function of the Lytic NK-Cell Immunological Synapse." *Nat. Rev. Immunol.* 8(9): 713–25.
- Owen-Schaub, L B et al. 1995. "Wild-Type Human p53 and a Temperature-Sensitive Mutant Induce Fas/APO-1 Expression." *Molecular and cellular biology* 15(6): 3032–40.
- Pan, G, J Ni, et al. 1997. "An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor

-
- for TRAIL." *Science (New York, N.Y.)* 277(5327): 815–18.
- Pan, G, K O'Rourke, et al. 1997. "The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL." *Science (New York, N.Y.)* 276(5309): 111–13.
- Patterson, G H, D W Piston, and B G Barisas. 2000. "Förster Distances between Green Fluorescent Protein Pairs." *Analytical biochemistry* 284(2): 438–40.
- Perez, Nestor et al. 1984. "Impaired Natural Killer Activity in Lymphohistiocytosis Syndrome." *The Journal of Pediatrics* 104(4): 569–73.
- Pescovitz, M D, and Mark D Pescovitz. 2006. "Rituximab , an Anti-CD20 Monoclonal Antibody : History and Mechanism of Action." (1): 859–66.
- Peters, P J et al. 1991. "Cytotoxic T Lymphocyte Granules Are Secretory Lysosomes, Containing Both Perforin and Granzymes." *The Journal of experimental medicine* 173(5): 1099–1109.
- Piston, David W, and Gert-Jan Kremers. 2007. "Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly." *Trends in biochemical sciences* 32(9): 407–14.
- Podack, E R, H Hengartner, and M G Lichtenheld. 1991. "A Central Role of Perforin in Cytolysis?" *Annual review of immunology* 9: 129–57.
- Pross, H F, and J a Maroun. 1984. "The Standardization of NK Cell Assays for Use in Studies of Biological Response Modifiers." *Journal of immunological methods* 68(1-2): 235–49.
- Punt, Jenni, Judith Owen, and M. a. Caligiuri. 2001. "The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets." *Trends in Immunology* 22(11): 633–40.
- Qiagen. 2011. "Quick-Start Protocol SYBR Green PCR." (January): 2–5.
- Rock, Kenneth L., and Hajime Kono. 2008. "The Inflammatory Response to Cell Death." *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease* 3: 99–126.
- Rosen, Steven D. 2004. "Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond." *Annual review of immunology* 22: 129–56.
- Schneider, E. et al. 2002. "Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Is Associated with Deficiencies of Cellular Cytolysis but Normal Expression of Transcripts Relevant to Killer-Cell-Induced Apoptosis." *Blood* 100(8): 2891–98.
- Schwarz, Eva C., and Shruthi Bhat. 2016. "Syntaxin 8 Is Required for Efficient Lytic Granule Trafficking in Cytotoxic T Lymphocytes." *Molecular Cell Research* in revisio.
- Sharma, K. et al. 2000. "Death the Fas Way: Regulation and Pathophysiology of CD95 and Its Ligand." *Pharmacology and Therapeutics* 88(3): 333–47.
- Shcherbo, Dmitry et al. 2009. "Practical and Reliable FRET/FLIM Pair of Fluorescent Proteins." *BMC biotechnology* 9: 24.
- Shi, Lianfa et al. 2005. "Granzyme B Binds to Target Cells Mostly by Charge and Must Be Added at the Same Time as Perforin to Trigger Apoptosis." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174: 5456–61.
- Sigma-Aldrich. 2007. "Fibronectin from Bovine Plasma."
- Stepp, S E et al. 1999. "Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." *Science (New York, N.Y.)* 286(5446): 1957–59.
- Stinchcombe, Jane C et al. 2006. "Centrosome Polarization Delivers Secretory Granules to the Immunological Synapse." *Nature* 443(7110): 462–65.
- Straus, Stephen E. et al. 2001. "The Development of Lymphomas in Families with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Germline Fas Mutations and Defective Lymphocyte Apoptosis." *Blood* 98(1): 194–200.
- SVI. 2015. "NyquistCalculator Scientific Volume Imaging."
- Taylor, Rebecca C, Sean P Cullen, and Seamus J Martin. 2008. "Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level." *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(3): 231–41.

- Tenopoulou, Margarita et al. 2007. "Does the Calcein-AM Method Assay the Total Cellular 'Labile Iron Pool' or Only a Fraction of It?" *The Biochemical journal* 403(2): 261–66.
- Théry, Clotilde, Matias Ostrowski, and Elodie Segura. 2009. "Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses." *Nature Reviews Immunology* 9(9): 581–93.
- Vandenabeele, Peter, Lorenzo Galluzzi, Tom Vanden Berghe, and Guido Kroemer. 2010. "Molecular Mechanisms of Necroptosis: An Ordered Cellular Explosion." *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(10): 700–714.
- Varma, Rajat et al. 2006. "T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster." *Immunity* 25(1): 117–27.
- Vermeulen, Katrien, Dirk R. Van Bockstaele, and Zwi N. Berneman. 2005. "Apoptosis: Mechanisms and Relevance in Cancer." *Annals of Hematology* 84(10): 627–39.
- Vivier, Eric et al. 2008. "Functions of Natural Killer Cells." *Nature immunology* 9(5): 503–10.
- Voskoboinik, I. et al. 2005. "Calcium-Dependent Plasma Membrane Binding and Cell Lysis by Perforin Are Mediated through Its C2 Domain: A CRITICAL ROLE FOR ASPARTATE RESIDUES 429, 435, 483, AND 485 BUT NOT 491." *Journal of Biological Chemistry* 280(9): 8426–34.
- Voskoboinik, Ilia et al. 2005. "Calcium-Dependent Plasma Membrane Binding and Cell Lygys by Perforin Are Mediated through Its C2 Domain: A Critical Role for Aspartate Residues 429, 435, 483, and 485 but Not 491." *Journal of Biological Chemistry* 280(9): 8426–34.
- Voskoboinik, Ilia, Mark J Smyth, and Joseph a Trapani. 2006. "Perforin-Mediated Target-Cell Death and Immune Homeostasis." *Nature reviews. Immunology* 6(12): 940–52.
- Voskoboinik, Ilia, James C Whisstock, and Joseph a Trapani. 2015. "Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology." *Nature reviews. Immunology* 15(6): 388–400.
- Voss, Matthias, Marcus Lettau, Maren Paulsen, and Ottmar Janssen. 2008. "Posttranslational Regulation of Fas Ligand Function." *Cell communication and signaling : CCS* 6: 11.
- Wyllie, A.H, J. F. R. Kerr, and A.R. Currie. 1980. "Cell Death: The Significance of Apoptosis." *International Review of Cytology* 68: 251–306.
- Youvan, Dc, Cm Silva, and Ej Bylina. 1997. "Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads." *Biotechnology* 3(1): 1–18.
- Zhang, Zhenzhen et al. 2013. "5,7-Dihydroxyflavone Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Human Tumor Cells via Regulation of Apoptosis-Related Proteins." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.

8 Danksagung

Ich danke meiner gesamten Familie für ihre warmherzige Unterstützung über all die Jahre.

Ich danke meiner Mutter für das Interesse, mit dem sie allen Erzählungen zuhörte und für den Antrieb, den sie mir damit gab. Ich danke meinem Vater für den Stolz, den ich stets spürte, wenn wir über mein Studium, meine Ambitionen und Zukunftspläne sprachen.

Ich widme diese Arbeit ganz besonders meinem verstorbenen Großvater Gerhard Schmitt, von dem ich mein technisches Verständnis und die Liebe zum Basteln und zur Problemlösung geerbt habe. Sehr früh habe ich von ihm eine Lektion gelernt, die mich geprägt hat:

„Wenn etwas fertig ist, sieht man nie, wieviel Zeit man darin investiert hat. Aber man sieht immer, wenn man ungenau gearbeitet hat.“

Ich bin der festen Überzeugung, dass mich diese Einstellung zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin.

Ich danke meiner Tante Doris, meinem Onkel Wolfgang, meiner Großmutter Ulla, meinem Bruder im Geiste Sebastian und allen, die mich begleitet und unterstützt haben: Franzi, Christoph, Denise, Angelina, Patti, Sabi, Moritz, Carmen, Mel, Mic, Nik, Base, allen Mitarbeitern des Biophysik-Labors und insbesondere Markus, der mir der beste Chef war, den ich in meiner Laufbahn hatte.

Ein ganz besonderer Dank gilt Carsten, der mir sowohl ein Mentor als auch ein Freund war und ist.